



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΡΑΦΑΗΛ ΑΓΓΕΛΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ - 2018

**Δημιουργία κυτταρικής σειράς *HeLa* με  
ενσωματωμένο διαγονίδιο που υπερεκφράζει  
επαγόγιμα το γονίδιο *FRA10AC1* του ανθρώπου**

**Creation of a stable *HeLa* cell line that inducibly  
overexpresses the human *FRA10AC1* gene**

# **Δημιουργία κυτταρικής σειράς *HeLa* με ενσωματωμένο διαγονίδιο που υπερεκφράζει επαγόγιμα το γονίδιο *FRA10AC1* του ανθρώπου**

**ΡΑΦΑΗΛ ΑΓΓΕΛΑΚΟΠΟΥΛΟΣ**

***ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ***

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Θεολογία Σαραφίδου** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**επιβλέπουσα**)

**Ζήσης Μαμούρης**, Καθηγητής, Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Καλλιόπη Λιαδάκη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

*And now, the end is near  
And so I face the final curtain  
I planned each charted course  
Each careful step along the byway  
And more, much more than this  
I did it my way  
Yes, there were times, I'm sure you knew  
When I bit off more than I could chew  
But through it all, when there was doubt  
I ate it up and spit it out  
I faced it all and I stood tall  
And did it my way  
For what is a man, what has he got  
If not himself, then he has naught  
To say the things he truly feels  
And not the words of one who kneels  
The record shows I took the blows  
And did it my way  
Yes, it was my way  
My way, Elvis Presley, 1973  
Original, Frank Sinatra 1969*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακής Γενετικής και Γενετικοί Δείκτες, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου καθηγήτριας Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών, κας Θεολογίας Σαραφίδου. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερως και θερμώς θα ήθελα να ευχαριστήσω (αν και την αδικεί το ευχαριστώ) για την υπέρ του δέοντος άριστη συνεργασία και την αδιάκοπη βοήθεια της καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας. Αποτέλεσε μέντορας και όχι απλώς επιβλέπουσα. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κ. Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών και την κα. Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διδάκτορα κ. Κώστα Σταμάτη για την άριστη καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθεια μέσα στο εργαστήριο. Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία συνάντησα μέσα στο εργαστήριο για την θετικότητα, την αγαστή συνεργασία, τις συμβουλές τους και καθοδήγησή τους στα πειράματα καθώς και για το πολύ φιλικό περιβάλλον. Επομένως, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους υποψήφιους διδάκτορες Ελένη Γαλλιοπούλου (Δρ. πλέον!), Θέμη Γιαννούλη, Μαρία Μαρκαντώνη, Ανδρέα Τσιπουρλιάνο και Δημήτρη Πλαγερά. Ένα ευχαριστώ και στους προπτυχιακούς φοιτητές που εκπονούσαν και εκπονούν τις πτυχιακές τους εργασίες στο εργαστήριο, Εύα Λεμονιά, Χριστίνα Γεωργίου, Γιώργο Μιχαλέττο και τα υπόλοιπα παιδιά για το πολύ καλό κλίμα μέσα στο εργαστήριο. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, που σε περιόδους άγχους απέδειξαν την φιλία τους με τον καλύτερο δυνατό τρόπο και ιδιαιτέρως την φίλη μου Ροδάνθη Ζινδριλή για τις συμβουλές της που με επανέφεραν στην τάξη καθώς και τους Νίκο Βουλγαράκη, Δημήτρη Γκουγκούδη, Χρήστο Γκουντινούδη και Αλέξανδρο Γκούμπινγκερ που σε σκοτεινούς καιρούς άγχους με στήριξαν στο να τελειώσω την εργασία αυτή. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου και τις αδερφές μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή **και** σε αυτό το κομμάτι των σπουδών μου.

## Περίληψη

Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην σπάνια αυτοσωματική εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* του ανθρώπου η οποία έχει συσχετιστεί με φαινότυπο ήπιας νοητικής υστέρησης. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής (spliceosome) και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επεξεργασία του πρόδρομου mRNA, δηλαδή στη συναρμογή, στη μεταγραφή και την έξοδο του ώριμου mRNA απ' τον πυρήνα. Η παρούσα εργασία εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της ανάλυσης και προσπάθειας ταυτοποίησης της λειτουργίας του *FRA10AC1*. Έγινε προσπάθεια δημιουργίας μιας κυτταρικής σειράς *HeLa* στην οποία θα είναι δυνατή η επαγόμενη υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου, μέσω αναλόγου του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη. Χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA4TO/*FRA10AC1* που περιλαμβάνει ως ένθεμα, το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου. Για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA έγινε καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα, και ακολούθησε γραμμοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής και διαμόλυνση κυττάρων *HeLa*. Μετά την καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής, αναπτύχθηκαν δύο κλώνοι κυττάρων οι οποίοι θα ελεγχθούν περαιτέρω για την ενσωμάτωση και την υπερέκφραση του διαγονιδίου.

Λέξεις κλειδιά: *FRA10AC1*, κύτταρα *HeLa*, επαγόμενη υπερέκφραση, σύστημα TREX.

## Abstract

The FRA10AC1 gene is mapped to the human *FRA10A* rare fragile chromosomal site which has been associated with a mild mental retardation phenotype. The FRA10AC1 protein has been identified as a component of the spliceosome and interacts with proteins involved in the processing of the precursor mRNA, i.e., assembly, transcription and exit of the mature mRNA from the nucleus. This work is part of the broader framework of analysis and effort to identify the operation of *FRA10AC1*. An attempt was made to create a *HeLa* cell line in which it would be possible to induce overexpression of the human *FRA10AC1* gene by an analogue of the antibiotic, tetracycline. The plasmid construct pcDNA4TO / FRA10AC1 with the full-length cDNA of the gene, was used. To produce a large amount of plasmid DNA, transformed bacteria were grown on a large scale, followed by linearization of the plasmid construct and transfection of HeLa cells. After culturing the cells in the presence of the antibiotic selection, two clones of cells were grown which would be further tested for the transgene incorporation and overexpression.

Keywords: *FRA10AC1*, *HeLa* cell lines, induced overexpression, TREX system.

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>5</b>
1.1. Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση <i>FRA10A</i> του ανθρώπου .....	5
1.2. Χρωμοσωμικές εύθραυστες θέσεις .....	5
1.2.1. Συνήθεις εύθραυστες θέσεις .....	6
1.2.2. Σπάνιες εύθραυστες θέσεις .....	6
1.3. Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i> χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i> .....	7
1.4. Πρωτεΐνη FRA10AC1 .....	9
1.4.1. Η FRA10AC1 σχετίζεται με μηχανισμούς επεξεργασίας mRNA .....	9
1.5. Επεξεργασία και ωρίμανση του mRNA .....	11
1.5.1. Διαδικασία συναρμογής .....	12
1.5.2. Μηχανισμός συναρμογής .....	12
1.5.3. Εναλλακτική συναρμογή .....	13
1.5.4. Ελάχιστον σωματίο συναρμογής .....	14
1.6. Η μεταγραφή πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη συναρμογή .....	14
1.7. Σκοπός .....	15
<b>2. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>17</b>
2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων .....	17
2.1.1. Καλλιέργεια βακτηρίων .....	17
2.2. Πλασμιδιακές κατασκευές .....	17
2.3. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> .....	18
2.4. Μετασχηματισμός βακτηρίων .....	19
2.5. Απομόνωση DNA .....	20
2.6. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα .....	21
2.7. Ποσοτικοποίηση και εκτίμηση ποιότητας DNA .....	22
2.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης .....	22
2.9. PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) .....	23

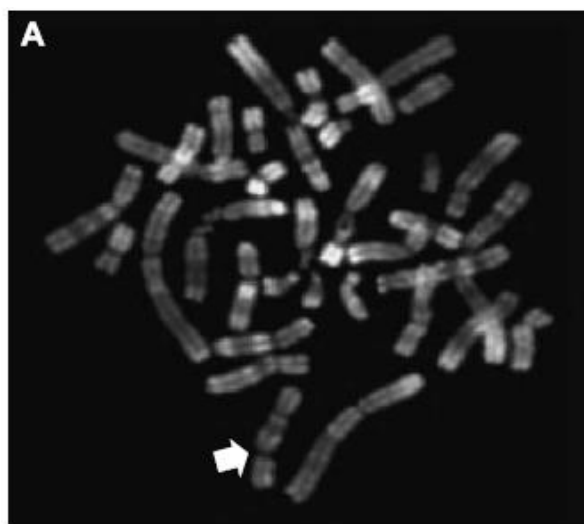


2.10. Ανάλυση Αλληλούχησης .....	24
2.11. Χειρισμός καλλιιεργειών κυττάρων <i>HeLa</i> .....	25
2.11.1. Συνθήκες και θρεπτικά καλλιέργειας.....	25
2.11.2. Ξεπάγωμα κυττάρων από υγρό άζωτο .....	26
2.11.3. Αλλαγή θρεπτικού υλικού .....	26
2.11.4. Θρυψινοποίηση κυττάρων .....	26
2.11.5. Πάγωμα κυττάρων <i>HeLa</i> .....	27
2.11.6. Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο .....	28
2.11.7. Διαμόλυνση κυττάρων .....	29
2.12. Επιλογή αποικιών και κλώνων.....	30
<b>3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....</b>	<b>32</b>
3.1. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής.....	32
3.1.1. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής με περιοριστικά ένζυμα.....	34
3.1.2. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής μέσω αλληλούχησης .....	36
3.1.3. Γραμμοποίηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου .....	37
3.2. Ποσοτικοποίηση DNA .....	38
3.3. Διαμόλυνση κυττάρων <i>HeLa</i> με το ανασυνδυασμένο pcDNA 4/TO- <i>FRA10AC1</i> .....	38
3.3.1. Έλεγχος ύπαρξης μυκοπλάσματος στις κυτταρικές σειρές <i>HeLa</i> .....	38
3.4. Διαμόλυνση και επιλογή αποικιών .....	40
<b>4. Συμπέρασμα .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>43</b>

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* του ανθρώπου

Η *FRA10A* είναι μια σπάνια αυτοσωματική εύθραυστη χρωμοσωματική θέση, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ (Εικόνα 1). Χαρτογραφείται στην χρωμοσωμική θέση 10q23.3 και είναι η πιο συχνά εμφανίσιμη εύθραυστη χρωμοσωμική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα 1:500 στα έμβρυα. Τα άτομα τα οποία φέρουν αυτήν την εύθραυστη χρωμοσωμική θέση εμφανίζουν κατά κανόνα μέτρια νοητική υστέρηση και αναπτυξιακή ανωμαλία (Sutherland, Leonard 1979). Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις που έγινε έλεγχος της γονεϊκής προέλευσης της *FRA10A*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κληρονόμησή της ήταν μητρικής προέλευσης.



**Εικόνα 1:** Α. Η εύθραυστη θέση *FRA10A* (βέλος) ως χάσμα στη χρωμοσωμική θέση 10q23.3 του ανθρώπου (Sarafidou et al. 2004).

### 1.2. Χρωμοσωμικές εύθραυστες θέσεις

Οι χρωμοσωμικές εύθραυστες θέσεις είναι συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι που εμφανίζουν χρωμοσωμικές αστάθειες που εμφανίζονται σαν κενά ή θραύσεις στα μεταφασικά χρωμοσώματα μετά από μερική αναστολή της σύνθεσης του DNA. Οι εύθραυστες θέσεις έχουν συσχετιστεί με γενωμική αστάθεια σε καρκινικά κύτταρα και με την ενεργοποίηση της επιδιόρθωσης του DNA σε περιοχές που αντιγράφονται προς το τέλος της φάσης S. Ωστόσο, όσο αποκαλύπτονται οι μηχανισμοί σχετικά με την αστάθεια των εύθραυστων θέσεων, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μηχανισμούς που

σχετίζονται με τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και με την επιδιόρθωση του DNA (Schwartz, Zlotorynski, and Kerem 2006).

#### 1.2.1. Συνήθεις εύθραυστες θέσεις

Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις είναι η μεγαλύτερη ομάδα εύθραυστων θέσεων. Σε αντίθεση με τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, οι συνήθεις συναντώνται σε όλα σχεδόν τα χρωμοσώματα και δεν είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων επέκτασης νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Οι συνήθεις εύθραυστες περιοχές είναι χρωμοσωμικές περιοχές πολύ ασταθείς και παρουσιάζουν χρωμοσωμικά χάσματα υπό την παρουσία αναστολέων της σύνθεσης του DNA (Yoder et al. 2007). Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις *FRA3B* (3p14.2), *FRA6E* (6q26) και *FRA16D* (16q23.2) έχουν χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο, καλύπτουν 4, 2 και 2.3 Mb αντίστοιχα και περιέχουν μεγάλου μήκους γονίδια, τα *FHIT* (1.5 Mb), *PARK2* (1.3 Mb), και *WWOX* (1.1 Mb). Επίσης, αρκετές άλλες συχνές εύθραυστων θέσεων περιέχουν πολύ μεγάλα γονίδια (όπως *LRP1B*, *DLG2* και *PTPRD*) και αποτελούν συχνά στόχοι μεταλλάξεων σε καρκίνους (Gao, 2017).

#### 1.2.2. Σπάνιες εύθραυστες θέσεις

Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις παρουσιάζονται σε ποσοστό λιγότερο του 5% στον πληθυσμό και συνήθως οφείλονται σε επέκταση νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις υποδιαιρούνται περεταίρω ανάλογα με τις συνθήκες εμφάνισής τους (Πίνακας. 1). Η κύρια ομάδα σπάνιων εύθραυστων περιοχών είναι η ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ που σχετίζεται με επέκταση επαναλήψεων CGG. Αυτή η ομάδα περιέχει την *FRAXA* στο γονίδιο *FMR1* που σχετίζεται για το σύνδρομο εύθραυστου X, και την *FRAXE* στο γονίδιο *FMR2* που σχετίζεται με νοητική υστέρηση. Επιπλέον, και άλλες αυτοσωμικές ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, εύθραυστες θέσεις, όπως η *FRA10A*, έχουν συσχετιστεί με νοητική υστέρηση (π.χ. Sutherland 1979). Άλλες εύθραυστες θέσεις μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ χαρακτηρίζονται από μεγάλες επαναλήψεις μικροδορυφόρων, είναι πλούσιες σε A-T και επάγονται με βρομοδεοξουριδίνη (BrdU) ή δισταμυκίνη A. Τέτοιες εύθραυστες θέσεις είναι οι *FRA10B*, *FRA16B* που περιέχουν 42bp και 33 bp επαναλήψεων μικροδορυφόρων πλούσιων σε A-T (Kooy 2009).

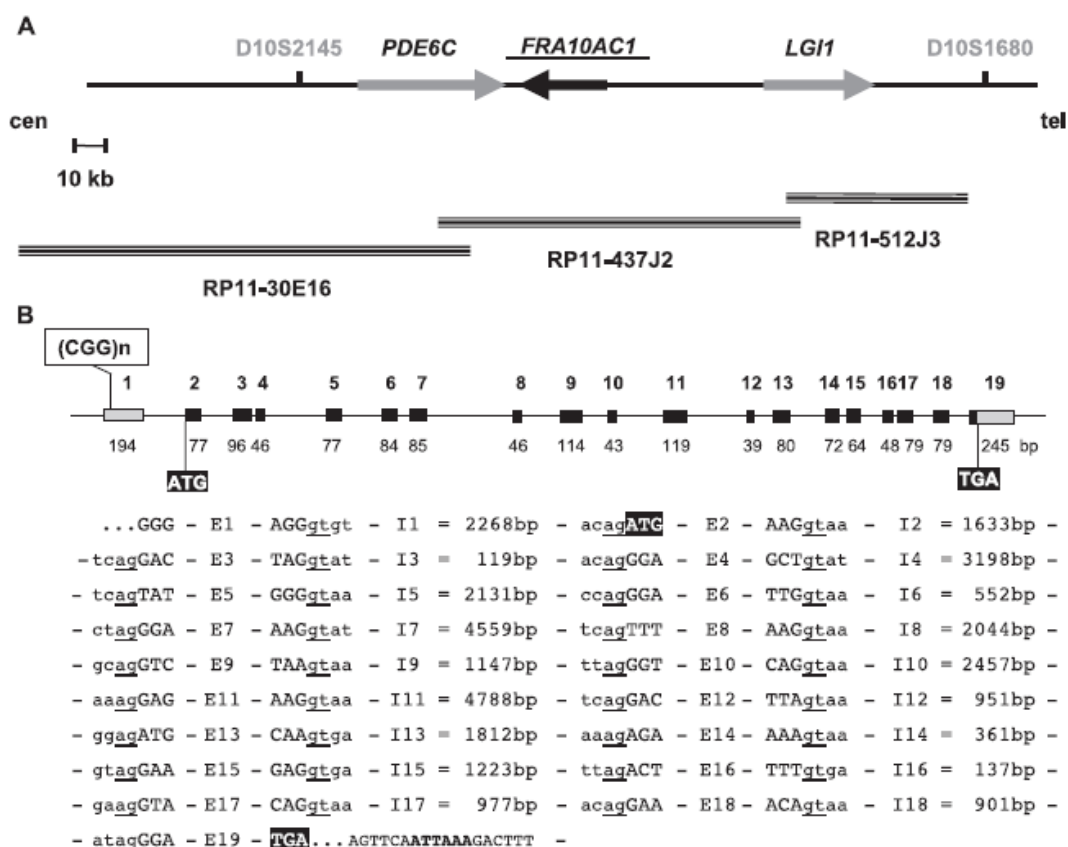
**Πίνακας 1. Κατάταξη εύθραυστων θέσεων (Yoder et al. 2007)**

	Αριθμός θέσεων	Αλληλουχία
<b>Σπάνιες εύθραυστες θέσεις</b>	<b>31</b>	
Ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ	24	Επανάληψη (CGG) <sub>n</sub>
Δυσταμυκίνη A	5	Επανάληψη πλούσια σε A-T
βρομοδεοξουριδίνη (BrdU)	2	
<b>Κοινές εύθραυστες περιοχές</b>	<b>87</b>	
Αφιδικολίνη	76	Επανάληψη πλούσια σε A-T
βρομοδεοξουριδίνη (BrdU)	7	
5-Αζακιτιδίνη	4	?

### 1.3. Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*

Έπειτα από ανάλυση FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) σε άτομα φορείς της *FRA10A* και χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή τον γονιδιωματικό κλώνο BAC RP11-437J2 (ο οποίος περιέχει ολόκληρο το γονίδιο *FRA10AC1*) βρέθηκε ότι αυτό χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*. Επίσης, με ανάλυση BLAST δείχθηκε ότι το γονίδιο είναι μοναδιαίο στο γονιδίωμα του ανθρώπου.

Με σύγκριση της πλήρους αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* με την γονιδιωματική αλληλουχία προσδιορίστηκε η γονιδιωματική οργάνωση του γονιδίου. Το γονίδιο *FRA10AC1* καταλαμβάνει μια περιοχή 33kb, περιέχει 19 εξώνια και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές (Εικόνα 2Α, Εικόνα. 2Β) (Sarafidou et al. 2004).



**Εικόνα 2: Γονιδιωματική οργάνωση του γονιδίου *FRA10AC1*.** (A) Το γονίδιο εντοπίζεται ανάμεσα απ' τα γονίδια *PDE6C*, *LGI1* και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές. (B) Απεικονίζονται Τα εξώνια (μαύρο χρώμα) οι μη μεταφραζόμενες περιοχές (γκρι χρώμα) καθώς και το μέγεθος των 19 εξωνίων (Sarafidou et al. 2004).

Το εξώνιο 1 αντιστοιχεί στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή και περιλαμβάνει τις τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις CGG. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στην αρχή του εξωνίου 2 και το κωδικόνιο λήξης στο τελευταίο εξώνιο. Από τα 19 εξώνια, τα 5 (13, 14, 15, 16 και 17) υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή. Όλα τα όρια των ιντρονίων περιέχουν τις συντηρημένες αλληλουχίες AG/GT στις δυο θέσεις συναρμογής (5' και 3' του ιντρονίου). Επίσης, το γονίδιο περιέχει μια επανάληψη CGG<sub>n</sub> στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του η οποία αποτελεί μέρος μιας νησίδας CpG. Η ανάλυση του πολυμορφισμού της επανάληψης CGG σε άτομα από τον γενικό πληθυσμό έγινε με PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που υβριδοποιούνταν στις αλληλουχίες που βρίσκονταν εκατέρωθεν της επανάληψης. Έτσι,δείχθηκε ότι η επανάληψη εμφανίζει 4 διαφορετικά αλληλόμορφα. Η ανάλυση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CGG)<sub>n</sub> στους φορείς της *FRA10A* έδειξε ότι, εκτός απ' το φυσιολογικό αλληλόμορφο, εμφανίζονται στην PCR και ζώνες μεγαλύτερου

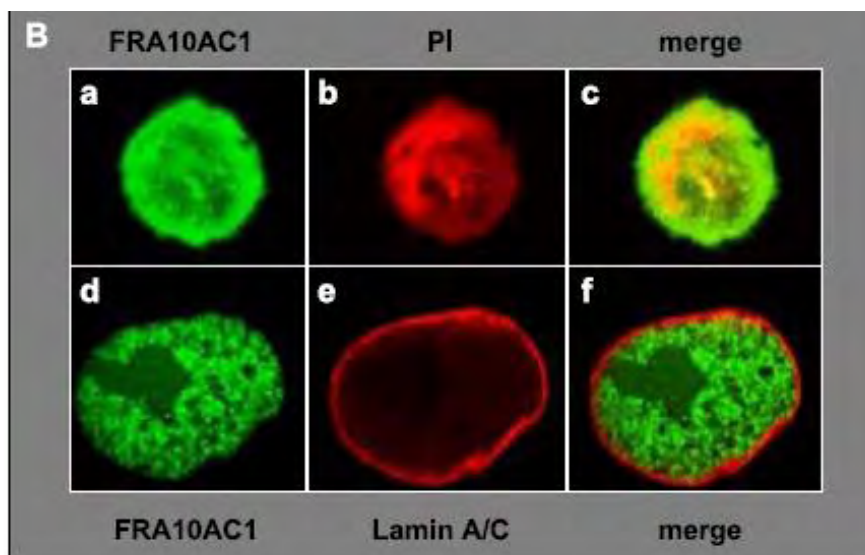
μεγέθους, γεγονός που υποδεικνύει την επέκταση της επανάληψης κατά τουλάχιστον 200 φορές. Τέλος, για να εξεταστεί αν οι επαναλήψεις CGG υπόκεινται σε μεθυλίωση, έγινε πέψη με περιοριστικά ένζυμα σε γονιδιωματικό DNA από άτομα φορείς της *FRA10A* και άτομα ελέγχου. Τα περιοριστικά ένζυμα, ήταν ευαίσθητα (*HpaII*) ή όχι (*MspI*) στην μεθυλίωση. Στη συνέχεια, η επανάληψη (CGG)<sub>n</sub> ενισχύθηκε με PCR η οποία δεν ήταν εφικτή στην περίπτωση που το DNA είχε τεμαχιστεί. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η υπερμεθυλίωση αυτής της περιοχής (Sarafidou et al. 2004).

Η ανάλυση της έκφρασης του *FRA10AC1* σε ιστούς ανθρώπου πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Northern. Έγινε υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας 2 ανιχνευτές απ' τους οποίους ο πρώτος υβριδοποιείται στο αρχικό τμήμα της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του *FRA10AC1* ενώ ο δεύτερος κάλυπτε ένα τμήμα του εξωνίου 19. Ένα μετάγραφο 1450bp το οποίο αντιστοιχούσε στο μέγεθος του cDNA του γονιδίου ανιχνεύθηκε σε όλους τους ιστούς που αναλύθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται καθολικά στον άνθρωπο. Επίσης, με RT (Reverse Transcription) - PCR σε cDNA από διάφορους ιστούς ανθρώπου με εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξώνια 11 και 19,δείχθηκε ότι υπάρχουν 5 εναλλακτικά μετάγραφα. Η σύγκριση των ακολουθιών των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά έδειξε ότι οι καρβοξυτελικές περιοχές είναι αυτές που διαφέρουν (Sarafidou et al. 2004).

#### 1.4. Πρωτεΐνη FRA10AC1

##### 1.4.1. Η FRA10AC1 σχετίζεται με μηχανισμούς επεξεργασίας mRNA

Η πρωτεΐνη FRA10AC1, είναι μια πυρηνική, εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη στους πολυκύτταρους και μονοκύτταρους ευκαρυώτες (Εικόνα 3), η οποία αποτελείται από 315 αμινοξέα.



**Εικόνα 3: Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης FRA10AC1.** Με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού φαίνεται ότι η πρωτεΐνη (πράσινο χρώμα) εντοπίζεται αποκλειστικά στο πυρηνόπλασμα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η λαμίνη A/C, πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου (Sarafidou et al. 2004).

Με απομόνωση παρασκευασμάτων του σωματίου συναρμογής και των υποσυμπλόκων του και ανάλυση φασματομετρίας μάζας, βρέθηκε ότι η FRA10AC1 εντοπίζεται σε καταλυτικά ενεργά υποσύμπλοκα συναρμογής, δηλαδή στο ενεργοποιημένο (activated) B και στο C καθώς και στο μετα-καταλυτικό σύμπλοκο P (Hegele et al. 2012; Wahl, Will, and Lührmann 2009; Papasaïkas et al. 2015) (βλ. 1.5) Επίσης, έχει δειχθεί ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με δύο παράγοντες συναρμογής, τους SF3B2 και DGCR14. Η άμεση αλληλεπίδρασή τους δείχθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα και με συνκατακρήμνιση. Για την συνκατακρήμνιση, η FRA10AC1 παράχθηκε σε βακτήρια σε σύντηξη με την GST και χρησιμοποιήθηκε για να συνκατακρημνίσει την DGCR14 ή την SF3B2 οι οποίες μεταφράστηκαν *in vitro* και ήταν επισημασμένες με ραδιενεργή μεθειονίνη. Επιπλέον, η ενδογενής FRA10AC1 συνανοσοκατακρημνίζεται με την DGCR14, σε κύτταρα *HeLa* (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018). Η πρωτεΐνη SF3B2 είναι το πιο καλά μελετημένο συστατικό του παράγοντα συναρμογής SF3b ο οποίος συνδέεται με το πρόδρομο mRNA και δεσμεύει το U2 snRNP στο σημείο διακλάδωσης. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη DGCR14 εξασφαλίζει την ακριβή συναρμογή του mRNA όταν η θέση συναρμογής δεν είναι η σωστή λόγω κάποιας μετάλλαξης βάσει πειραμάτων σε κύτταρα θηλαστικών (Hadjikyriacou et al. 2015; Takada 2015).

Οι πρωτεΐνες DGCR14, SF3B2 και FRA10AC1 συνεντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με παροδική έκφραση της ανασυνδυασμένης GFP-FRA10AC1 και της Xpress-DGCR14 σε κύτταρα *HeLa* στα οποία ανιχνεύθηκε ταυτόχρονα και η ενδογενής SF3B2. Επίσης, από άλλες μελέτες μεγάλης κλίμακας, κυρίως με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, έχειδειχθεί ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με άλλες 25 πρωτεΐνες που εντοπίζονται, στην πλειοψηφία τους, στον πυρήνα του κυττάρου (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018). Από αυτές τις πρωτεΐνες, οι 17 έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, ενώ 10 από αυτές εμπλέκονται λειτουργικά στην διαδικασία επεξεργασίας του mRNA, δηλαδή στην συναρμογή [SF3B2, DGCR14 (Kotake et al. 2007; Takada 2015), U2AF1, PRPF3, MFAP1, IK, η CHERP και η HABP4 (Tanackovic et al. 2011; Ulrich and Wahl 2017; Fei et al. 2016), στη ρύθμιση της μεταγραφής [NKP και SAP30BP], και στην έξοδο του mRNA απ' τον πυρήνα (THOC1, Song et al. 2013). Τέλος, πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε ομική ανάλυση σε μεταγραφικό, πρωτεϊνικό και μεταβολικό επίπεδο των επιπτώσεων καταστολής του γονιδίου *FRA10AC1* σε κλώνους κυττάρων *HeLa*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι, μεταξύ άλλων, επηρεάζεται η έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την επεξεργασία του mRNA και γενικότερα η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε υπό το πρίσμα της συμμετοχής της FRA10AC1 στην επεξεργασία του mRNA και στο σωματίο συναρμογής (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018). Όλα τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής της FRA10AC1 στη διαδικασία επεξεργασίας του mRNA.

### 1.5. Επεξεργασία και ωρίμανση του mRNA

Η επεξεργασία του mRNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η επεξεργασία αρχίζει με την τροποποίηση του 5' άκρου του mRNA, προσθέτοντας μια δομή που ονομάζεται καλύπτρα. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της συναρμογής κατά την οποία αποκόπτονται τα ιντρόνια. Επιπρόσθετα ακολουθεί η διαδικασία της δημιουργίας του 3' άκρου του mRNA μέσω της πολυαδενυλίωσης. Είναι πλέον γνωστό, ότι τα παραπάνω στάδια επεξεργασίας πραγματοποιούνται ταυτόχρονα (Herzel et al. 2017).



### 1.5.1. Διαδικασία συναρμογής

Η συναρμογή του πρόδρομου mRNA ανακαλύφθηκε 40 χρόνια πριν ανεξάρτητα απ' τους Phillip Sharp και Richard Roberts.

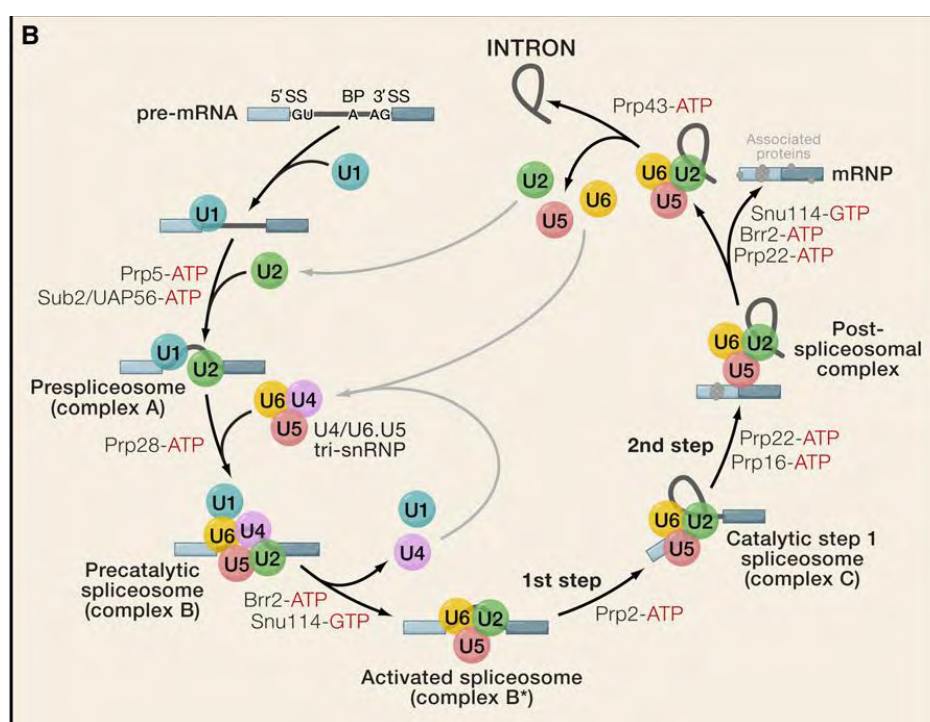
Η αποτελεσματική αφαίρεση των ιντρονίων, με ακρίβεια ενός νουκλεοτιδίου είναι απαραίτητη για τα ευκαρυωτικά κύτταρα να παράγουν το σωστό mRNA. Για να επεξεργαστούν τα 5' και 3' άκρα είναι απαραίτητη η ύπαρξη πολλαπλών σωματίων συναρμογής για την αφαίρεση των ιντρονίων από το πρόδρομο mRNA (Herzel et al. 2017).

Η συναρμογή του πρόδρομου mRNA καταλύεται από μια ριβονουκλεοπρωτεϊνική μηχανή μοριακού βάρους 4-5 MDa, το σωματίο συναρμογής (spliceosome). Τα περισσότερα ιντρόνια του πρόδρομου mRNA απομακρύνονται από το εξαρτώμενο απ' την υπομονάδα U2, μείζον σωματίο συναρμογής που συναντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επίσης, υπάρχει το ελάσσων σωματίο συναρμογής, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, που εξαρτάται απ' την υπομονάδα U12 το οποίο πραγματοποιεί την συναρμογή σπανίων ιντρονίων πρόδρομου mRNA που απαντώνται σε ένα υποσύνολο ευκαρυωτών (Fabrizio and Lührmann 2012).

### 1.5.2. Μηχανισμός συναρμογής

Εντός του σωματίου συναρμογής, η αφαίρεση των ιντρονίων απ' το πρόδρομο mRNA προχωρά με δύο αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Ενδιάμεσα των δύο αντιδράσεων κρίσιμο ρόλο τόσο στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής όσο και στην καταλυτική ενεργοποίηση του σωματίου συναρμογής παίζουν το RNA και οι πρωτεΐνες που αποτελούν τα snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein) (Will and Lührmann 2011). Αρχικά, η υπομονάδα U1 snRNP αλληλεπιδρά με την 5' θέση συναρμογής του προδρόμου mRNA για να σχηματίσει το λεγόμενο σύμπλοκο E (early). Στη συνέχεια η υπομονάδα U2 snRNP δεσμεύεται στη θέση διακλάδωσης εντοπίζοντας την πρωτεΐνη BBP (branch binding protein) σχηματίζοντας το σύμπλοκο A. Έπειτα γίνεται αναδιάταξη του συμπλόκου A ώστε να αλληλεπιδράσει με τις υπομονάδες U4/U6 και U5 snRNP, οι οποίες αποτελούν το tri-snRNP, δημιουργώντας το, απενεργοποιημένο ακόμα, σύμπλοκο B. Μετά από αναδιάταξεις και απελευθέρωση των υπομονάδων U1 και U4 σχηματίζεται το ενεργοποιημένο σύμπλοκο B-activated το οποίο

μετασχηματίζεται στο καταλυτικά ενεργοποιημένο σύμπλοκο B\*. Το τελευταίο αυτό σύμπλοκο είναι ικανό να καταλύσει το πρώτο στάδιο της συναρμογής, το οποίο οδηγεί στην δημιουργία του συμπλόκου C. Η δεύτερη αντίδραση μετεστεροποίησης πραγματοποιείται όταν η υπομονάδα U5 φέρνει σε επαφή τα δύο εξώνια και στη συνέχεια το προϊόν mRNA απελευθερώνεται, ενώ το αποκομμένο ιντρόνιο παραμένει δεσμευμένο σε θηλιά στις υπομονάδες U2, U5 και U6. Τέλος, αυτά τα snRNPs διαχωρίζονται και μπορούν να συμμετάσχουν στον επόμενο γύρο συναρμογής (Konarska, Vilardell, and Query 2006). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, όπου φαίνεται όλος ο κύκλος πραγματοποίησης της συναρμογής ανιχνεύονται οκτώ εξελικτικά συντηρημένες ATPάσες/ελικάσες εξαρτώμενες από RNA. Αυτές ενεργούν σε συγκεκριμένα στάδια της συναρμογής για να καταλύουν αναδιατάξεις RNA-RNA και αναπροσαρμογή των RNPs (Wahl, Will, and Lührmann 2009).



**Εικόνα 4: Ο κύκλος της συναρμογής** (Wahl, Will, and Lührmann 2009). Φαίνονται τα υποσύμπλοκα που αποτελούν το σωματίο συναρμογής και τα στάδια ενεργοποίησής τους.

### 1.5.3. Εναλλακτική συναρμογή

Περισσότερο απ' το 90% των ανθρώπινων γονιδίων υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή (Braunschweig et al. 2013) η ρύθμιση της οποίας μπορεί να είναι ιστοειδική

ή να επάγεται από αναπτυξιακές αλλαγές. Επιπλέον, η εναλλακτική συναρμογή έχει δείχθει ότι μπορεί να ρυθμίζεται από εξωτερικά ερεθίσματα. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις εναλλακτικής συναρμογής πραγματοποιούνται με έναν απ' τους εξής τέσσερις τρόπους: εναλλακτική επιλογή 5' θέσης συναρμογής, εναλλακτική επιλογή 3' θέσης συναρμογής, προσθήκη ή παράλειψη εξωνίου και διατήρηση ιντρονίου (Nilsen and Graveley 2010).

#### 1.5.4. Ελάχιστον σωματίο συναρμογής

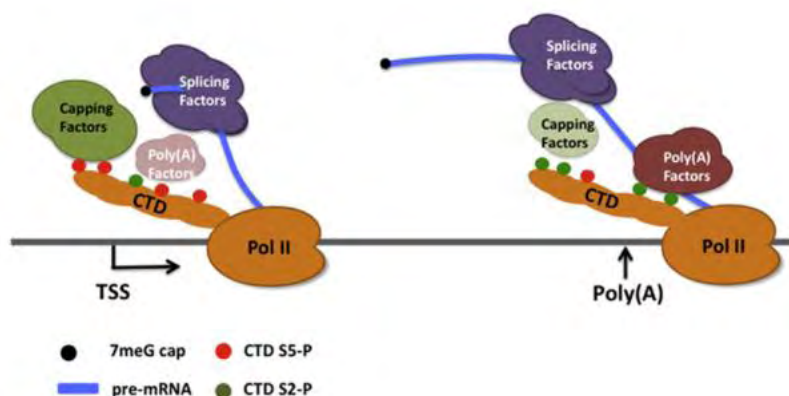
Το σωματίο συναρμογής που είναι εξαρτώμενο από το U12 (ελάχιστον) περιέχει τέσσερα συγκεκριμένα snRNPs, τις υπομονάδες U11, U12, U4atac και U6atac, κάθε μία απ' τις οποίες περιέχουν ένα συγκεκριμένο snRNA. Η υπομονάδα U5 snRNP είναι κοινή στα δύο σωματίδια, ελάχιστον και μείζον. Οι υπομονάδες U4atac, U6atac και U5 σχετίζονται σε ένα tri-snRNP που μοιάζει με το tri-snRNP του μείζονος σωματίου συναρμογής U4/U6.U5, και η πρωτεϊνική σύνθεση των μείζονος και ελάχιστονος tri-snRNPs φαίνεται να είναι πολύ κοινή αλλά όχι ταυτόσημη. Αντίθετα, ενώ οι κύριες υπομονάδες U1 και U2 snRNPs είναι διαφορετικές στο μείζον σωματίο συναρμογής, οι αντίστοιχες υπομονάδες στο ελάχιστον βρίσκονται μαζί ως U11/U12 δις-snRNP (Turunen et al. 2013).

#### 1.6. Η μεταγραφή πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη συναρμογή

Η συναρμογή σχετίζεται λειτουργικά με ποικίλες διεργασίες που αφορούν την επεξεργασία του mRNA (Saldi et al. 2016). Συγκεκριμένα έχει φανεί ότι παράγοντες συναρμογής συνεισφέρουν στη στρατολόγηση σημαντικών παραγόντων επιμήκυνσης της μεταγραφής στα σημεία παύσης της RNA πολυμεράσης II, με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της διαδικασίας και την ταυτόχρονη έναρξη της συναρμογής (Saldi et al. 2016). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II λειτουργεί ως σημείο «συγκέντρωσης» για πολλούς παράγοντες επεξεργασίας του RNA συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμμετέχουν στην προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο του μεταγράφου. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο ενώνεται στην 5' καλύπτρα, συνεισφέρει στην στρατολόγηση των U1 snRNP και του U4/U6·U5 snRNP στο πρόδρομο μετάγραφο μέσω αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά τους (Pabis et al. 2013), στην επεξεργασία του 3' άκρου του μεταγράφου (Davidson, Muniz, and West 2014),

στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα (Elbarbary and Maquat 2016) και την αποικοδόμηση του ώριμου mRNA εάν αυτό δεν είναι κατάλληλο για να μεταφραστεί. Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου, το οποίο στρατολογείται στο mRNA στον πυρήνα, λειτουργούν ως μόρια «αναγνώρισης» στο κυτταρόπλασμα για πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το ριβόσωμα προκαλώντας την παύση της μετάφρασης στο σημείο που υπάρχει λάθος (Hir, Saulière, and Wang 2016). Τα παραπάνω αποτελούν και σημαντικές ενδείξεις για τη σύζευξη των διαδικασιών της μεταγραφής και της συναρμογής με τις λοιπές διεργασίες επεξεργασίας του mRNA (Proudfoot, Furger, and Dye 2002; Maniatis and Reed 2002).

Για αυτό, το σωματίδιο συναρμογής δεν περιέχει μόνο παράγοντες συναρμογής αλλά και παράγοντες μεταγραφής και επιπλέον πολλούς άλλους που σχετίζονται με άλλες διαδικασίες ως επί το πλείστον της επεξεργασίας του mRNA (Agafonov et al. 2011; Bessonov et al. 2010).



Εικόνα 5: Η συναρμογή συμβαίνει ταυτόχρονα με την μεταγραφή (Saldi et al. 2016).

### 1.7. Σκοπός

Η εργασία αυτή ανήκει στην ευρύτερη προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας της πρωτεΐνης FRA10AC1 του ανθρώπου. Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* στην περιοχή 10q23.3 του χρωμοσώματος 10 η οποία έχει συσχετιστεί με φαινότυπο ήπιας νοητικής υστέρησης σε άτομα φορείς. Η

πρωτεΐνη αυτή αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην συναρμογή, στη μεταγραφή και την έξοδο του ώριμου mRNA απ' τον πυρήνα. Στο πλαίσιο της εργασίας ο στόχος ήταν η δημιουργία μιας κυτταρικής σειράς *HeLa* στην οποία θα είναι δυνατή η επαγόμενη υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου, μέσω αναλόγου του αντιβιοτικού τετρακυκλίνης,

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων

Για την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) και για τη στερεή καλλιέργεια το θρεπτικό LB άγαρ (Bertani, et al., 1951).

Η υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε κατά τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων, για την ανάπτυξη μοναδιαίων αποικιών και στην απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα. Χρησιμοποιήθηκε LB συγκέντρωσης 25g/l (Scharlau, 02-385) διαλυμένο σε νερό (H<sub>2</sub>O) και ακολούθως οι φιάλες αποστειρώθηκαν σε κλίβανο ατμού. Για τη στερεή καλλιέργεια παρασκευάστηκαν τρυβλία Petri με LB άγαρ (Scharlau, 01-385) συγκέντρωσης 40g/l, διαλυμένο σε νερό. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε αποστείρωση του θρεπτικού μέσου σε κλίβανο ατμού. Με το πέρας χρονικού διαστήματος 20min για την σταθεροποίηση του θρεπτικού μέσου στα τρυβλία (25ml έκαστο), αυτά αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

Γενικά το αντιβιοτικό (βλ. παρακάτω) προστέθηκε στο υγρό θρεπτικό αφού αυτό είχε έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στο στερεό θρεπτικό προστέθηκε σε θερμοκρασία περίπου 50°C ώστε να μην καταστραφεί το αντιβιοτικό και να μην σταθεροποιηθεί το άγαρ.

#### 2.1.1. Καλλιέργεια βακτηρίων

Η καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί μεγάλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA, μετά από μετασχηματισμό (βλ. παρακάτω). Απ' το ήδη υπάρχον τρυβλίο έγινε εμβολιασμός παίρνοντας μία αποικία η οποία επώαστηκε σε 2 ml υγρού LB παρουσία αμπικιλίνης σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 100mg/ml. Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό επιλέχθηκε λόγω του φορέα που χρησιμοποιήθηκε (βλ. παρακάτω). Τα κύτταρα επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C για 18h. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 200μl κυττάρων στην φιάλη των 200ml παρουσία αντιβιοτικού και έγινε επώαση στις ίδιες συνθήκες.

### 2.2. Πλασμιδιακές κατασκευές

Για την διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa* χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO που φέρει ενσωματωμένο το πλήρους μήκους cDNA του

γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου (Πτυχιακή εργασία Α. Κρόμελ, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2016).

Ο pcDNA<sup>tm</sup>4/TO είναι ένας φορέας έκφρασης μεγέθους 5,1kb και αποτελεί μέρος του συστήματος T-Rex<sup>tm</sup>. Ο φορέας αυτός επιτρέπει την επαγόμενη, μέσω τετρακυκλίνης, έκφραση cDNA, σε κύτταρα θηλαστικών τα οποία έχουν συνδιαμολυνθεί με τον φορέα pcDNA<sup>TM</sup>6/TR ο οποίος παράγει τον καταστολέα Tet. Ο φορέας pcDNA<sup>tm</sup>4/TO περιέχει δύο ρυθμιστικές περιοχές τετρακυκλίνης στον εγγύ υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (*CMV*) για την έκφραση, του επιθυμητού cDNA (Invitrogen 2011a). Οι αλληλουχίες TetO<sub>2</sub> αποτελούν θέσεις δέσμησης για τέσσερα μόρια του καταστολέα Tet. Απουσία τετρακυκλίνης η έκφραση του γονιδίου στόχου καταστάλθηκε από την συνδεση των ομοδιμερών του καταστολέα Tet στις αλληλουχίες των TetO<sub>2</sub> (Hillen and Berens 1994). Η παρουσία τετρακυκλίνης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων αναίρεσε την καταστολή του υβριδικού υποκινητή CMV/TetO<sub>2</sub>, στον pcDNA<sup>TM</sup>4/TO, και επέτρεψε την έκφραση του γονιδίου στόχου. Ο τρόπος με τον οποίο προσδένεται η τετρακυκλίνη, με υψηλή συγγένεια, σε κάθε μόριο καταστολέα, άλλαξε την στερεοδιαμόρφωσή του καθιστώντας τον ανενεργό να προσδεθεί στις ρυθμιστικές περιοχές του TetO<sub>2</sub> του pcDNA<sup>TM</sup>4/TO (F. Yao et al. 1998) (βλ. Εικόνα 7, αποτελέσματα)

### 2.3. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων *E.coli*

Για τον μετασχηματισμό βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα *E. coli* στελέχους *DH5a* (Chung, Niemela, and Miller 1989).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία δεκτικών κυττάρων είναι η εξής: αρχικά, έγινε επίστρωση κυττάρων *E. coli* σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (βλ παραπάνω) και ολονύκτια επώαση στους 37°C. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε μία μοναδιαία αποικία και καλλιεργήθηκε σε 2ml θρεπτικού υλικού LB στους 37°C για 18h υπό ανάδευση στις 210rpm. Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκε 1ml καλλιέργειας κυττάρων σε 200ml υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες, μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας να είναι OD<sub>600</sub> ~0,7-0,8, δηλαδή η καλλιέργεια να είναι σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Έπειτα, η υγρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε falcons των 50ml και τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 10min. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και έγινε επαναιώρηση της πελέτας, αρχικά σε ελάχιστη ποσότητα

διαλύματος 80mM MgCl<sub>2</sub> 20mM CaCl<sub>2</sub> για την επαναιώρηση των κυττάρων. Έπειτα, προστέθηκαν ~30ml του ίδιου διαλύματος. Τα κύτταρα επώστηκαν σε πάγο για 20min. Στη συνέχεια, έγινε επαναφυγοκέντρηση στις 4000rpm για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναιωρήθηκε η πελέτα, σε ελάχιστο όγκο διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> θερμοκρασίας 4°C. Συμπληρώνονται από το ίδιο διάλυμα 2ml. Ακολούθως, προστέθηκαν 70μl κρυοπροστατευτικού διαλύματος DMSO (dimethyl sulfoxide), στάγδην, υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα, συμπληρώθηκαν άλλα 70μl διαλύματος DMSO και μεταφέρθηκε το εναιώρημα των κυττάρων σε αποστειρωμένα σωληνάρια eppendorfs, που φυλάχθηκαν στους -80°C.

#### 2.4. Μετασχηματισμός βακτηρίων

Μετασχηματισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα βακτήριο δέχεται τμήματα ελεύθερου DNA προερχόμενα από άλλη πηγή (π.χ. πλασμίδια). Επειδή, δεν είναι όλα τα κύτταρα ικανά για την πρόσληψη εξωγενούς DNA *in vivo*, χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα (competent cells). Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων επιτυγχάνεται με την προσωρινή αύξηση της θερμοκρασίας στους 42°C και την απότομη μείωσή της με την τοποθέτηση των κυττάρων σε πάγο (Sambrook et al., 1989).

Για την διαδικασία μετασχηματισμού βακτηρίων *E. coli* αποψύχθηκαν δεκτικά κύτταρα στελέχους *DH5a* από τους -80°C τοποθετώντας τα σε πάγο για 10min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1μl (1,4μg) το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO-*FRA10AC1* και το δείγμα αναδεύτηκε ελαφρώς. Ακολούθησε επώση στον πάγο για 20min, θερμικό σοκ στους 42°C για 90sec σε υδατόλουτρο και τοποθέτηση του δείγματος σε πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml υγρό LB παρουσία αντιβιοτικού, έγινε ήπια ανάδευση των κυττάρων και επώση στους 37°C για 1h, για να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη. Για την συλλογή τους, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 2500rpm για 10min. Έπειτα, αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα με ήπια ανάδευση. Ακολούθως έγινε η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία Petri, που περιείχαν στερεό θρεπτικό με αμικικιλίνη, τα οποία είχαν αποξηρανθεί στους 37°C. Επώστηκαν ολονύχτια στους 37°C και τέλος, αποθηκεύθηκαν στους 4°C.



## 2.5. Απομόνωση DNA

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με 2 τρόπους. Για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA, για την διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* (βλ. παρακάτω) έγινε απομόνωση με επώαση με πρωτεΐνωση K και εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA που στάλθηκε για αλληλούχηση έγινε με την χρήση kit.

Για την συλλογή βακτηρίων από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια έγινε φυγοκέντρηση για 30min στις 3000rpm στους 4°C. Απομακρύνθηκε τελείως το θρεπτικό υλικό και στα κύτταρα προστέθηκε 0,5ml διαλύματος 15mM Tris.Cl, 10mM EDTA pH 8 για την επαναιώρηση της πελέτας. Έπειτα, προστέθηκαν επιπλέον 4,5ml του ίδιου διαλύματος. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 5ml διαλύματος 200mM NaOH, 1% SDS και έγινε ήπια ανάδευση, ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων και η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τέλος, προστέθηκαν 5ml διαλύματος 3M CH<sub>3</sub>COOK για να γίνει η εξουδετέρωση. Έγινε ισχυρή ανάδευση και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 20min. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4°C στις 3000rpm για 30min. Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για 10min στις 13000rpm. Οι φυγοκεντρήσεις αυτές έγιναν, ώστε να απομακρυνθούν τα συσσωματά των κυττάρων. Ακολούθως, έγινε η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με ισοπροπανόλη όγκου ίσου με το 0,8 του αρχικού όγκου του δείγματος και επώαστηκε στην κατάψυξη. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 20 min και σε 4°C για την αφαίρεση της ισοπροπανόλης. Προστέθηκαν περίπου 5ml αιθανόλης 70% για την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης, έγινε ήπια ανάδευση και απόρριψή της. Έγινε αποξήρανση του DNA με επώαση στους 50°C για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη και το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύθηκε σε 500μl απεσταγμένο, απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.

Για την αποικοδόμηση του RNA, το DNA επώαστηκε με RNAση (100x, 10mg/ml) στους 37°C για 1h. Ακολουθήθηκε επώαση με πρωτεΐνωση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (2x, 20%SDS, 5M NaCl, Tris-HCl 1M, 0,5M EDTA pH 7,5) για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στους 55°C ολονύκτια.

Για την απομάκρυνση της RNAσης και της πρωτεΐνάσης K έγινε εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο ως εξής: στο δείγμα προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφορμίου (αναλογία όγκων 1:1) και έγινε ισχυρή ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 10000rpm. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο, και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μέχρι η μεσόφαση να μην είναι διακριτή. Προστέθηκε χλωροφόρμιο ίσο με τον όγκο του διαλύματος και επαναφυγοκεντρήθηκε για 10min στις 10000 rpm. Τέλος, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης σε τελική συγκέντρωση 70-75%. Έγινε ήπια ανάδευση και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000rpm για 10min. Για την απομάκρυνση της αιθανόλης και επαναδιάλυσης του DNA ακολουθήθηκε η διαδικασία για την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης που αναφέρθηκε παραπάνω. Το DNA επαναιωρήθηκε σε όγκο 600μl. Απ' την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την διαδικασία αυτή, απομονώθηκε μεγάλη ποσότητα της τάξης των δεκάδων μg.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (NoLid) της εταιρίας MACHEREY-NAGEL (740499.250) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Επίσης, έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από κλώνους κυττάρων *HeLa* για τον έλεγχο ύπαρξης μυκοπλάσματος (βλ. παρακάτω) με την χρήση του kit NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue MACHEREY-NAGEL (740952.250) της εταιρίας σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

## 2.6. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Πραγματοποιήθηκε πέψη με διάφορα ένζυμα περιορισμού που έκοψαν τόσο τον φορέα όσο και το ένθεμα της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA4/TO-*FRA10AC1*. Οι πέψεις έγιναν ώστε να ελεγχθεί η ακεραιότητα του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου και για να γίνει γραμμικό ώστε να είναι πιο εύκολη η ενσωμάτωσή του, στο γονιδίωμα μετά τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς *HeLa*. Γενικά, η πέψη έγινε με όγκο ενζύμου που δεν ξεπερνάει το 1/10 του τελικού όγκου του δείγματος καθώς τα ένζυμα περιέχουν γλυκερόλη και η αύξησή της οδηγεί σε αναστολή της αντίδρασης.

Ειδικότερα, για τον έλεγχο της ακεραιότητας της πλασμιδιακής κατασκευής χρησιμοποιήθηκαν ~4,5μg πλασμιδιακού DNA σε τελικό όγκο 20μl με τα ένζυμα περιορισμού *SspI* (R0132S) και *BglIII* (R0144S) (5000units/ml) από την εταιρεία NEB.

Χρησιμοποιήθηκαν 2μl από τα ρυθμιστικά διαλύματα NeBuffer SspI (Ref B0132) και NeBuffer 3.1 (Ref B7203S) αντίστοιχα, συγκέντρωσης 10x και έγινε η επώαση του δείγματος στους 37°C ολονύκτια.

Για την διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa* έγινε γραμμοποίηση 140 μg κυκλικού πλασμιδιακού DNA. Η πέψη έγινε με το περιοριστικό ένζυμο ScaI-HF (Ref R3122S) (5000units/ml) με 20μl ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart® Buffer (10x) (B7204S) της εταιρίας NEB. Η πέψη έγινε σε τελικό όγκο 200μl.

## 2.7. Ποσοτικοποίηση και εκτίμηση ποιότητας DNA

Η ποσοτικοποίηση και εκτίμηση της καθαρότητας του DNA έγινε με τη χρήση φασματοφωτομέτρου στα 260nm. Φωτομετρήθηκε 1μl DNA αραιωμένο σε 49μl H<sub>2</sub>O.

Η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA έγινε βάσει του λόγου της απορρόφησης στα 260nm προς τα 280nm. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ύπαρξης πρωτεϊνών στο μείγμα καθώς οι πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm (Sambrook and Russel, D 2000). Γενικά ο αποδεκτός λόγος είναι  $\lambda \geq 1,8$ .

## 2.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσω ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο ανάλογα με το μέγεθός τους. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους ως 25 kb. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μόρια DNA καθώς μετακινούνται σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA. Τα μόρια DNA δεν είναι ορατά γίνονται όμως ορατά με προσθήκη στο πήκτωμα μιας κατάλληλης χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA η οποία φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Sambrook, et. al. 1989).

Τα πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν για το έλεγχο προϊόντων PCR, για ποσοτικοποίηση του DNA και για τον έλεγχο των πέψεων. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων του DNA που ηλεκτροφορήθηκαν χρησιμοποιήθηκε και η ανάλογη

συγκέντρωση αγαρόζης (1% για γονιδιωματικό DNA και 2% για προϊόντα PCR) στο πήκτωμα.

Η προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης έγινε με διάλυση κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης, ανάλογα με το καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, σε διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1x από πυκνό διάλυμα 50x (200mM Tris, 200mM CH<sub>3</sub>COOH, 1mM EDTA) και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων. Το διάλυμα ψύχθηκε με νερό μέχρι η θερμοκρασία να είναι περίπου 50°C ώστε να μην αρχίσει η πήξη της αγαρόζης και στη συνέχεια προστέθηκε η χρωστική SERVA (Kat.-Nr. 39803) (2μl ανά 100ml πηκτώματος).

Ακολουθήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων όπου αναμιγνύθηκαν με loading buffer [(10ml) Bromophenol blue 1ml 1% w/v, TBE 20x 0,5ml, Glycerol 5ml, ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml, 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in H<sub>2</sub>O].

## 2.9. PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μοριακή *in vitro* μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA, ακόμα και δισεκατομμύριες φορές, μέσω ενζύμου. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR περιέχει τρία στάδια: Το στάδιο της αποδιάταξης του DNA, κατά το οποίο το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C, το στάδιο της υβριδοποίησης, στο οποίο οι εκκινητές υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες και το στάδιο πολυμερισμού του DNA κατά το οποίο δημιουργείται η συμπληρωματική αλυσίδα με την Taq πολυμεράση (Mullis et al., 1983). Στην παρούσα εργασία, η PCR έγινε για ανίχνευση παρουσίας μυκοπλάσματος σε DNA που είχε απομονωθεί από τα κύτταρα *HeLa* (βλ. παραπάνω), αφού το μυκόπλασμα σε αρχικά στάδια μόλυνσης δεν επηρεάζει τα κύτταρα και δεν φαίνεται στο μικροσκόπιο. Το μυκόπλασμα ανήκει σε ένα γένος βακτηρίων που δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα σε αντίθεση με τα κοινά βακτήρια. Χωρίς κυτταρικό τοίχωμα είναι απρόσβλητα από πολλά κοινά αντιβιοτικά, όπως η πενικιλίνη τα οποία στοχεύουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Η PCR έγινε με τους εκκινητές MGSO (εμπρόσθιος) και GPO-3 (ανάστροφος) (Young et al. 2010). Παράλληλα, στο ίδιο DNA έγινε PCR και για ένα τμήμα γονιδίου που αποτέλεσε τον θετικό έλεγχο του πειράματος, για να φανεί αν η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ήταν κατάλληλη για PCR. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι

εκκινητές για τμήμα του γονιδίου της προθρομβίνη, PRO\_f (εμπρόσθιος), PRO\_r (ανάστροφος). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον Πίνακα 2 ενώ στον Πίνακα 3 φαίνεται το μίγμα για την εκτέλεση της PCR.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών μυκοπλάσματος και του θετικού μάρτυρα

MGSO	Μυκόπλασμα	5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3'
GPO-3		5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T 3'
PRO_f	Θετικός μάρτυρας	5' TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3'
PRO_r		5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C 3'

Πίνακας 3. Μίγμα PCR (τελικός όγκος 50μl)

Μίγμα PCR (50μl)	
Γονιδιωματικό DNA (50-200 ng/μl)	1 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1 μl
Ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (με 15mM MgCl <sub>2</sub> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1 μl
Νουκλεοτίδια 20x	1 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	0.3 μl
H <sub>2</sub> O	38,7 μl

Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl και χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Για την PCR εφαρμόστηκαν 40 κύκλοι ενίσχυσης, μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA και πριν την τελική επιμήκυνση στις παρακάτω συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 3min
- Αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 15sec
- Υβριδοποίηση των εκκινητών στο εκμαγείο DNA στους 55°C για 15sec
- Επιμήκυνση DNA από την Taq πολυμεράση στους 72 °C για 30sec
- Τελική επιμήκυνση DNA στους 72 °C για 10min

## 2.10. Ανάλυση Αλληλούχησης

Η αλληλούχηση έγινε στην εταιρία CeMIA (<https://cemia.eu>) με τους εκκινητές που υβριδοποιούνται σε γνωστές θέσεις του φορέα οι οποίες βρίσκονται πριν τα άκρα του

ενθέματος (βλ. Εικόνα 8, Αποτελέσματα). που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO-*FRA10AC1*. Η αλληλουχία των εκκινητών φαίνεται στον Πίνακα 4. Η ανάλυση των δεδομένων που προήλθαν από την αλληλούχηση έγινε με το πρόγραμμα BioEdit (Bioedit Sequence Alignment Editor) (Έκδοση 7.0.5.3) (Hall 1999).

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών για αλληλούχηση

Εμπρόσθιος εκκινητής CMV_for	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
Ανάστροφος εκκινητής BGH_rev	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

## 2.11. Χειρισμός καλλιιεργειών κυττάρων *HeLa*

Η κυτταρική σειρά *HeLa*, αποτελεί την πρώτη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά που καλλιεργήθηκε στο εργαστήριο και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα. Τα κύτταρα *HeLa* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον George Gey (1899-1970) από καρκίνο τραχήλου της μήτρας της κ. Henrietta Lacks, η οποία τελικά απεβίωσε. Τα κύτταρα *HeLa* είναι τριπλοειδή (3n) (Ghosh S. & Ghosh I. 1975) και πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα. Τα κύτταρα μπορούν να ξεπεράσουν τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να υποστούν, πριν την διαδικασία της γήρανσης (Masters 2002).

### 2.11.1. Συνθήκες και θρεπτικά καλλιέργειας

Τα κύτταρα *HeLa* αναπτύχθηκαν προσκολλημένα, σχηματίζοντας μονοστοιβάδες σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, Cat. No.: 41966) εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO, Cat. No.: 10270) και αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη (1% streptomycin-penicillin, GIBCO, Cat. No.: 15140), ώστε να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση από μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό μέσο DMEM περιείχε διάφορα θρεπτικά υλικά για τα κύτταρα όπως αμινοξέα, γλυκόζη, βιταμίνες και άλλα ανόργανα συστατικά για τη ρύθμιση του pH ενώ ο FBS παρείχε στα κύτταρα αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες για την υποστήριξη των μηχανισμών κυτταρικής διαίρεσης (T. Yao and Asayama 2017). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα και αναπτύχθηκαν σε κατάλληλα δοχεία κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκες T-75cm<sup>2</sup> ή T-25 cm<sup>2</sup> Corning, Cat. No 430720, 430168) σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C, κατάλληλων επιπέδων CO<sub>2</sub> (5%)

για την διατήρηση του pH στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Για την επίτευξη ασηπτικών/άσηπτων συνθηκών χρησιμοποιήθηκε απαγωγός κάθετης νηματικής ροής. Επίσης ο χώρος εργασίας και τα υλικά ήταν αποστειρωμένα με 70% αιθανόλη και ήταν απαραίτητη η χρήση γαντιών.

#### 2.11.2. Ξεπάγωμα κυττάρων από υγρό άζωτο

Τα κύτταρα φυλάσσονται μακροχρόνια σε υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Για την καλλιέργεια κυττάρων από το άζωτο λήφθηκε φιαλίδιο με κύτταρα και τοποθετήθηκε γρήγορα σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 5min ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα. Επίσης, στους  $37^{\circ}\text{C}$  θερμάνθηκε και το θρεπτικό υλικό DMEM+FBS 10%. Τοποθετήθηκε 1ml κυττάρων που ξεπαγώσαν σε φλάσκα συμπληρωμένη με 5ml για φλάσκα T25 και 14ml για φλάσκα T75 θρεπτικού. Τα κύτταρα, επωάζονται σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  και συγκέντρωση 5%  $\text{CO}_2$ .

#### 2.11.3. Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Για την αλλαγή θρεπτικού υλικού θερμάνθηκε το θρεπτικό DMEM+FBS 10% και το PBS. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπάρχον θρεπτικό υλικό με χρήση πιπέτας Paster με αντλία κενού και προστέθηκαν 5ml PBS για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα από την φλάσκα. Η φλάσκα ανακινήθηκε ελαφρώς και στη συνέχεια, αφαιρέθηκε όλο το PBS και προστέθηκαν 5ml θρεπτικού υλικού DMEM+FBS 10%. Οι φλάσκες στη συνέχεια επανατοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα.

#### 2.11.4. Θρυψινοποίηση κυττάρων

Για την θρυψινοποίηση των κυττάρων, δηλαδή την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, θερμάνθηκε στους  $37^{\circ}\text{C}$  το θρεπτικό υλικό DMEM+FBS 10%, το PBS+EDTA και η θρυψίνη (GIBCO, Cat No.: 15400-054). Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που σχηματίζεται στο έντερο από θρυψινογόνο. Καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών σε μερικώς διασπασμένες πρωτεΐνες και ορισμένες φυσικές πρωτεΐνες (Rawlings and Barrett 1994). Με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν είχαν καλύψει το ~80% της διαθέσιμης επιφάνειας. Αρχικά, αφαιρέθηκε το υπάρχον θρεπτικό υλικό απ' τις φλάσκες και προστέθηκε 4 ml PBS+EDTA για να αποσπαστεί τα νεκρά κύτταρα ώστε να απομακρυνθούν απ' τη φλάσκα, η οποία τοποθετήθηκε πλαγιαστά και

ανακινήθηκε ελαφρώς ώστε να γίνει ευκολότερη η απόσπαση των νεκρών κυττάρων. Έπειτα, αφαιρέθηκε το PBS+EDTA και προστέθηκε 1ml θρυψίνη για την επαναιώρηση των κυττάρων απ' τη φλάσκα. Αφέθηκε να επωαστεί για 1min και ανακινήθηκε έντονα, χτυπώντας τα πλαϊνά τοιχώματα ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να σταματήσει η ενεργότητα της θρυψίνης προστέθηκαν 5ml θρεπτικού υλικού, το οποίο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες. Το διάλυμα με την βοήθεια της πιπέτας ανακινήθηκε έντονα ώστε να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων. Τέλος, μεταφέρθηκαν στην μεγάλη φλάσκα 5ml διαλύματος απ' την μικρή φλάσκα και συμπληρώθηκε με θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 15ml. Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα σε συνθήκες 37°C, και 5% CO<sub>2</sub>.

Σε τυχόν αραίωση κυττάρων στις φλάσκες λόγω υπερβολικής ύπαρξης κυττάρων, θερμαίνεται στους 37°C το θρεπτικό υλικό DMEM+FBS 10%, το PBS+EDTA και η θρυψίνη. Αρχικά, αφαιρέθηκε όλο το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστέθηκε 4ml PBS+EDTA. Η φλάσκα τοποθετήθηκε στο πλάι και αναδεύθηκε ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα αφαιρώντας το PBS+EDTA. Στη συνέχεια, προστέθηκε θρυψίνη όγκου 0,5-1,5ml (ανάλογα το μέγεθος της φλάσκας), αφέθηκε να επωαστεί για 1min και ανακινήθηκε και χτυπήθηκε έντονα στα πλαϊνά τοιχώματα ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Έπειτα, προστέθηκαν 4ml θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Το διάλυμα πιπετάρεται έντονα, ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα κυττάρων. Αφαιρέθηκε ποσότητα διαλύματος μέχρι τελικού όγκου 1/10 του αρχικού όγκου και συμπληρώθηκε θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 5ml για φλάσκα T25 και 12ml για φλάσκα T75 και τα κύτταρα επωάζονται στις προαναφερθείσες συνθήκες.

#### 2.11.5. Πάγωμα κυττάρων *HeLa*

Για την διαδικασία παγώματος των κυττάρων *HeLa* θερμάνθηκε στους 37°C το θρεπτικό υλικό DMEM+FBS 10%, το PBS+EDTA και η θρυψίνη. Αρχικά, αφαιρέθηκε όλο το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστέθηκε 7ml PBS+EDTA. Ακολούθως, τοποθετήθηκε η φλάσκα στο πλάι και αναδεύθηκε ώστε να αποσπαστούν τα νεκρά κύτταρα με στόχο την απόρριψή τους και έπειτα, αφαιρέθηκε όλο το PBS+EDTA. Έπειτα, προστέθηκε θρυψίνη όγκου 1,5ml, αφέθηκε να επωαστεί για 1min και ανακινήθηκε και χτυπήθηκε έντονα στα πλαϊνά τοιχώματα ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα και προστέθηκαν 8ml θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της

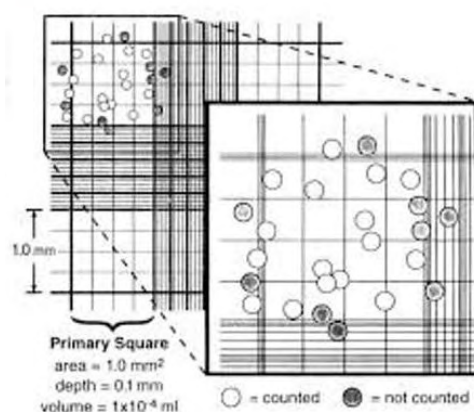


θρυψίνης. Το διάλυμα πιπετάρεται έντονα ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα κυττάρων και έπειτα τοποθετήθηκε σε falcon των 15ml. Για την καθίζηση των κυττάρων το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min στα 160g και παράλληλα, προετοιμάστηκε διάλυμα FBS με προσθήκη 10% κρυοπροστατευτικού DMSO (Dimethyl sulfoxide, SIGMA, Cat No.: D2650). Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο απ' το falcon ώστε να παραμείνει μόνο το ίζημα των κυττάρων, προστέθηκε ελάχιστος ορός (300μl) για να γίνει επαναιώρηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστέθηκε ο υπόλοιπος ορός στο falcon με τα κύτταρα. Τέλος, χωρίστηκε ο όγκος του διαλύματος σε φιαλίδια για κάθε φλάσκα που πάγωσε. Τα τρία φιαλίδια τυλίχθηκαν με χαρτί, όρθια και τοποθετήθηκαν αρχικά στους -20°C και στη συνέχεια στην κατάψυξη στους -80°C.

#### 2.11.6. Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο. Το αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο, κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές, διαθέτει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από εννιά κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες ισαπέχουσες γραμμές (απέχουν μεταξύ τους 2,5μm), με βάση τις οποίες καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του τετραγώνου. Κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα διαιρείται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Αρχικά, παίρνονται 10μl διαλύματος και τοποθετήθηκε στην πλάκα Neubauer ανάμεσα στην πλάκα και την καλυπτρίδα. Η διαδικασία στοχεύει στην μέτρηση αντιπροσωπευτικού δείγματος κυττάρων πάνω στην πλάκα. Η καταμέτρηση έγινε στα μικρά τετράγωνα στο κέντρο στο πάνω ή στο κάτω πλέγμα της πλάκας. Κάθε τετράγωνο περιείχει 16 μικρά τετράγωνα που οριοθετούνται με απλές γραμμές. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε συνοπτικά, είναι η εξής: αρχικά πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο. Έπειτα, μεταφέρθηκαν 10μl από το εναιώρημα, στο αιμοκυτταρόμετρο έτσι, σε κάθε τετράγωνο εισήχθη 0,1 μl. Με την βοήθεια μικροσκοπίου μετρήθηκαν τα κύτταρα σε κάθε τεταρτημόριο ξεχωριστά και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των κυττάρων και πολλαπλασιάστηκε επί  $10^4$  διότι ο όγκος που καταλαμβάνει το κυτταρικό εναιώρημα σε καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι  $0,1\text{mm}^3$  που ισούται με  $10^{-4}\text{cm}^3$  ( $1\text{cm}^3$  ισοδυναμεί με 1ml). Ανάλογα με τον μέσο όρο

των κυττάρων και τον αριθμό των κυττάρων που θα τοποθετηθεί σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν και τα ανάλογα  $\mu\text{l}$  διαλύματος.



**Εικόνα 6: πλάκα Neubauer.** Εμφανίζεται ενδεικτικά, μεγενθυμένο ένα τετράγωνο μέτρησης κυττάρων

#### 2.11.7. Διαμόλυνση κυττάρων

Η διαμόλυνση κυττάρων μπορεί να γίνει είτε άμεσα με την εισαγωγή DNA στον πυρήνα κυττάρων μέσω μικροέγχυσης, είτε έμμεσα με την ενεργή ή παθητική πρόσληψη του DNA απ' το κύτταρο. Συνήθως στις δεύτερες, χρησιμοποιούνται ιϊκοί φορείς ή επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του DNA και χημικών παραγόντων και μέσω ενεργής μεταφοράς των νουκλεϊκών οξέων στον πυρήνα (Keown, Campbell, and Kucherlapati 1990). Η χρήση χλωριούχου ασβεστίου για την διαμόλυνση κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την ενίσχυση της μολυσματικότητας του DNA του αδενοϊού (Graham and van der Eb 1973). Σε όλες αυτές τις διαδικασίες, το καθαρισμένο DNA προστίθεται σε buffers που περιέχουν φωσφορικά και χλωριούχο ασβέστιο και σχηματίζεται ένα λεπτό ίζημα που στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα (Keown, Campbell, and Kucherlapati 1990). Από την ανάμιξη ενός ρυθμιστικού διαλύματος με HEPES με ένα διάλυμα που περιείχε χλωριούχο ασβέστιο και DNA, δημιουργήθηκε ένα ίζημα από φωσφορικά, ασβέστιο και DNA. Το ίζημα αυτό προσκολλήθηκε στην επιφάνεια των κυττάρων. Το φωσφορικό ασβέστιο διευκόλυνε την δέσμευση του DNA, μέσα στο ίζημα, στην επιφάνεια των κυττάρων και στη συνέχεια μέσω της ενδοκυττάρωσης εισήλθε στο

κύτταρο. Η προσθήκη του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος στο διάλυμα DNA-χλωριούχου ασβεστίου βοήθησε στην δημιουργία πιο σταθερού ιζήματος, σημαντικό καθώς το συσσωματωμένο DNA δεν θα προσκολληθεί ή δεν θα εισέλθει τόσο εύκολα στα κύτταρα (Kingston, Chen, and Okayama 2003).

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HeLa χρειάστηκε μια μέρα πριν να γίνει σπάσιμο και μέτρηση των κυττάρων σε τρυβλία καλλιέργειας των 10cm<sup>2</sup> (Corning, Cat. No 430167) με κάλυψη 70% δηλαδή 2x10<sup>6</sup> κύτταρα (βλ. 2.9.4, 2.9.6). Δύο ώρες (2h) πριν την διαμόλυνση έγινε αλλαγή θρεπτικού υλικού DMEM όγκου 9ml. Αρχικά αραιώθηκαν 20μg/μl DNA (τα μl του DNA είναι ανάλογα με την πυκνότητα του διαλύματος) σε H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 450μl. Στη συνέχεια, έγινε vortex του διαλύματος και προστέθηκε 2,5M CaCl<sub>2</sub> έπειτα από διήθηση, όγκου 50μl και επαναλήφθηκε το vortex. Παράλληλα, έπειτα από διήθηση προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα, στο υδατικό διάλυμα, το φωσφορικό διάλυμα HEBS 2X (280mM NaCl, 50mM Hepes, 1,5mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) με pH>7.1(~7.12) όγκου 500μl. Ανακινήθηκε το διάλυμα και αφέθηκε για 20min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Η προσθήκη του Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> στο διάλυμα του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων (με τη μορφή λεπτών κρυστάλλων) μεταξύ του DNA και των θετικά φορτισμένων μορίων-φορέων, τα οποία προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση (Kim and Eberwine 2010). Σε αυτά τα 20min δημιουργήθηκαν συσσωματώματα DNA-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> τα οποία πρέπει να ελέγχονται ώστε να μην θολώσει το διάλυμα. Το μίγμα μετά από 20 min ήταν διαυγές και προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα (κλώνος #4), τα οποία είχαν μια κάλυψη περίπου 60-70% . Μετά από περίπου 12h, από το πέρας της διαμόλυνσης, αφαιρέθηκαν το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, ξεπλύθηκαν με PBS και προστέθηκαν 10ml θρεπτικού υλικού.

## 2.12. Επιλογή αποικιών και κλώνων

Η επιλογή των αποικιών των κυττάρων *HeLa* έγινε με την χρήση του αντιβιοτικού ζεοσίνη. Η ζεοσίνη είναι ένα γλυκοπεπτίδιο που ανήκει στην οικογένεια αντιβιοτικών μπλεομυκίνης. Προκάλεσε κυτταρικό θάνατο καθώς παρεμβάλλεται στο DNA και επάγει θραύσεις στη διπλή έλικα (Murray et al., 2014). Η ανθεκτικότητα των κυττάρων *HeLa* στην ζεοσίνη είναι αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA4/TO-FRA10AC1. Για την διαπίστωση του ρυθμού θανάτου των κυττάρων

*HeLa* στην ζεοσίνη έγινε επίστρωση κυττάρων σε 6well (βλ. παραπάνω) στις συγκεντρώσεις 300μg/ml, 500μg/ml, 700μg/ml από αρχική συγκέντρωση 100mg/ml.

Η επιλογή αποικιών κυττάρων από κάθε τρυβλίο έγινε με την βοήθεια του μικροσκοπίου (10x μεγέθυνση), όπου οι παρατηρηθείσες αποικίες σημειώθηκαν με μαρκαδόρο στην κάτω, εξωτερική, επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM από κάθε τρυβλίο και έγινε έκπλυση με 1x PBS και απορρίφθηκε. Στα τρυβλία τοποθετήθηκαν ειδικοί αποστειρωμένοι κύλινδροι πάνω από κάθε σημειωμένη αποικία με την βοήθεια λαβίδας. Οι συγκεκριμένοι κύλινδροι (cloning cylinders, Sigma, Cat. No C1059-1EA, όγκου 150μl) είχαν διάμετρο 8mm έτσι ώστε να περικλείσουν κάθε σημειωμένη αποικία. Το σύστημα στεγανοποιήθηκε, και σταθεροποιήθηκε ο κύλινδρος με την χρήση βαζελίνης. Μέσα στον κύλινδρο προστέθηκε ~20μl θρυψίνης και ακολούθησε επώαση μέχρις ότου να αποκολληθεί η αποικία από την επιφάνεια του τρυβλίου. Το κάθε περιεχόμενο του κυλίνδρου αναδεύτηκε με πιπετάρισμα για να αποφευχθούν συσσωματώματα. Επίσης, προστέθηκε θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό ζεοσίνη όγκου ~100μl. Αναδεύτηκε ήπια και έγινε μεταφορά κυττάρων σε 12-well plate (Corning, Cat. No 3527). Τέλος, αφέθηκαν τα κύτταρα στο θρεπτικό και έγινε αλλαγή θρεπτικού υλικού DMEM ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η καλλιέργεια των αποικιών συνεχίστηκε σε σταδιακά μεγαλύτερη επιφάνεια μέχρι φλάσκες εμβαδού 25cm<sup>2</sup>.

### 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η κυτταρική σειρά *HeLa* στην οποία έχει ενσωματωθεί το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*. Ειδικότερα, σε αυτήν τη σειρά βρίσκεται ενσωματωμένο ένα διαγονίδιο το οποίο περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης για τον TetR. Έτσι, παρουσία του TetR, η έκφραση του γονιδίου του καταστολέα της τετρακυκλίνης καταστέλλεται. Αντίθετα, όταν προστεθεί εξωγενώς ανάλογο τετρακυκλίνης, αυτή δεσμεύει τον καταστολέα και έτσι επιτυγχάνεται η έκφραση του γονιδίου.

Παρόλο που η υπερέκφραση θα μπορούσε να επιτευχθεί και με παροδική διαμόλυνση, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε παρουσιάζει το πλεονέκτημα της επαγόμενης υπερέκφρασης από όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας. Αντίθετα, κατά την παροδική διαμόλυνση, το ποσοστό των κυττάρων που λαμβάνουν το διαγονίδιο είναι περιορισμένο και δύσκολα μπορεί να ξεπεράσει το 50%, γεγονός που μπορεί να συνεπάγεται «θόρυβο» ή χαμηλό σήμα.

#### 3.1. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής

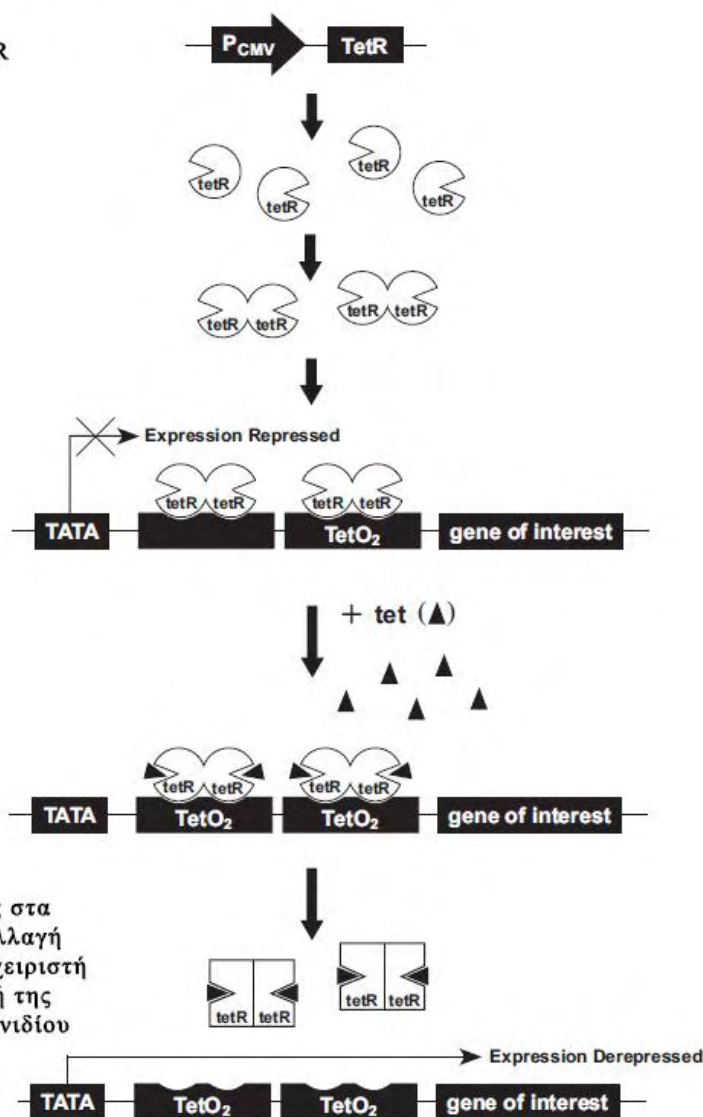
Για τη δημιουργία της σταθερής κυτταρικής σειράς που θα υπερεκφράζει επαγόμενα το γονίδιο *FRA10AC1* χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA 4/TO-*FRA10AC1* (Πτυχιακή εργασία Α. Κρόμελ, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2016). Ο pcDNA 4/TO είναι ένας φορέας 5.1kb ο οποίος περιέχει το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*. Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιείται και συνδυάζεται μαζί με το πλασμίδιο pcDNA 6/TR, για την ελεγχόμενη, μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη (μόνιμη ή παροδική), έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών (Εικόνα 7).

1. Η πρωτεΐνη tetR εκφράζεται απ' τον pcDna6/TR σε καλλιέργεια κυττάρων

2. Τα ομοδιμερή της TetR προσδένονται στους 2 χειριστές TetO<sub>2</sub> στον φορέα έκφρασης, καταστέλλοντας την μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου

3. Η τετρακυκλίνη προσδένεται στα ομοδιμερή της TetR

4. Η πρόσδεση της τετρακυκλίνης στα ομοδιμερή της TetR προκαλεί αλλαγή στην tetR, απελευθέρωση του χειριστή της τετρακυκλίνης και επαγωγή της μεταγραφής του επιθυμητού γονιδίου



**Εικόνα 7. Απεικόνιση του συστήματος T-Rex.** Το συγκεκριμένο σύστημα αποτελεί συνδυασμό δύο πλασμιδίων, pcDNA6/TR και pcDNA4/TO με στόχο την επαγόμενη υπερέκφραση ενός γονιδίου με ανάλογο τετρακυκλίνης (Invitrogen 2011b).

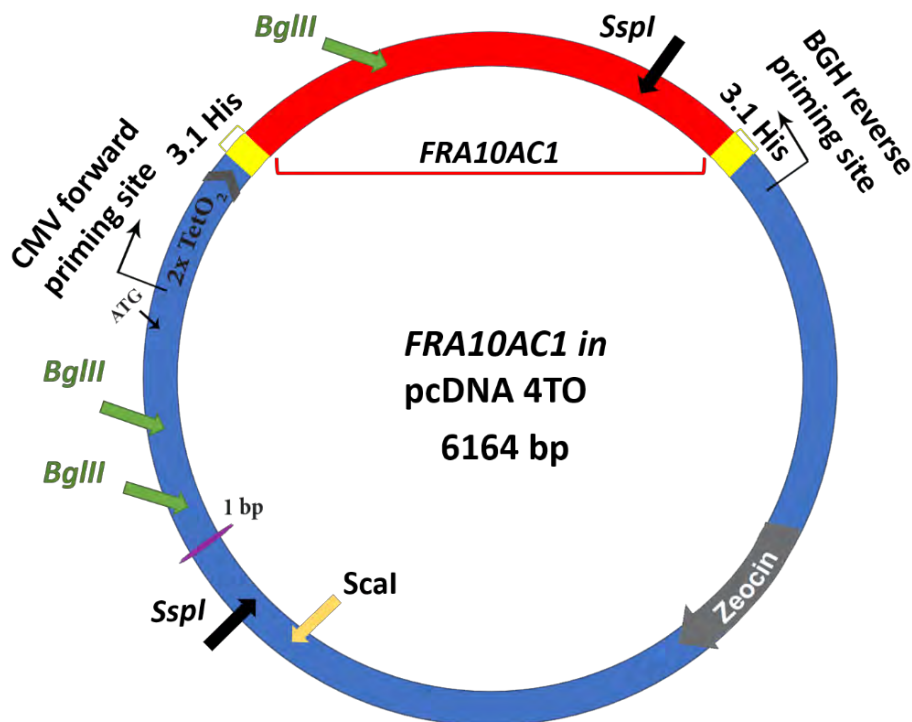
Επομένως, για να γίνει η διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa*, που περιέχουν την πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA 6/TR, προηγήθηκε η απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA και η γραμμοποίησή του με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Επίσης, έγινε έλεγχος τόσο της ποιότητας όσο και της ακεραιότητας του πλασμιδιακού DNA. Για να ελεγχθεί η ακεραιότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ακολουθήθηκαν δύο τεχνικές, η χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων και η αλληλούχηση.

### 3.1.1. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής με περιοριστικά ένζυμα

Για τον έλεγχο της πλασμιδιακής κατασκευής μέσω της διαδικασίας της πέψης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που τεμαχίζουν τόσο το ένθεμα όσο και τον φορέα pcDNA4/TO (Εικόνα 8). Αφού έγινε αναζήτηση της πρότυπης αλληλουχίας του φορέα και του ενθέματος στη βάση δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), ευρέθησαν τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα με την βοήθεια του προγράμματος WebCutter2.0. (<http://heimanlab.com/cut2.html>) Τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέχθηκαν, γιατί δίνουν διακριτά μεταξύ τους τμήματα, είναι τα *SspI* και *BglIII*.

Ο μη ανασυνδυασμένος φορέας pcDNA4/TO έχει μέγεθος 5078bp ενώ μετά την ενσωμάτωση του ενθέματος είναι 6164bp. Το ένθεμα που αντιστοιχεί το γονίδιο *FRA10AC1* προήλθε από μια άλλη πλασμιδιακή κατασκευή στον φορέα pcDNA 3.1 His C/*FRA10AC1* ο οποίος φέρει το cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1*. Έπειτα από την απομόνωση του ενθέματος με περιοριστικά ένζυμα, προέκυψαν και δύο τμήματα στην 5' και 3' περιοχή του ενθέματος που ανήκαν στον φορέα pcDNA 3.1 His.

Ακόμη, το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται πριν το ένθεμα στον φορέα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα. Τα επιλεγμένα περιοριστικά ένζυμα κόβουν σε τμήματα την πλασμιδιακή κατασκευή, όπως φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 8. Συγκεκριμένα, το *SspI* δημιουργεί δύο τμήματα μεγέθους 1740bp και 4424bp και το *BglIII* τρία τμήματα μεγέθους 438bp, 688bp και 4652bp αντίστοιχα. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμα ένζυμο, το *ScaI* ώστε να γίνει η πλασμιδιακή κατασκευή γραμμική (βλ. παρακάτω).

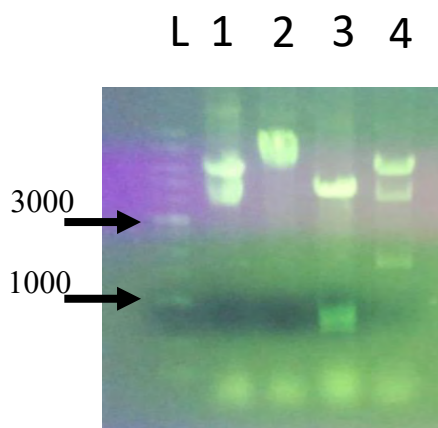


**Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pcDNA 4/TO-*FRA10AC1* με τα περιοριστικά ένζυμα *SspI*, *BglII* και *ScaI*. Με μπλε συμβολίζεται το πλασμίδιο pcDNA4/TO και με κόκκινο το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*. Με κίτρινο χρώμα φαίνονται τα δύο τμήματα του πλασμιδίου pcDNA3His από το οποίο προήλθε το ένθεμα. Ακόμα φαίνεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, ο χειριστής της τετρακυκλίνης και η θέση έναρξης της μετάφρασης. Με βέλη διαφορετικού χρώματος απεικονίζονται οι θέσεις στις οποίες κόβουν τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, σημειώνονται οι θέσεις στις οποίες υβριδοποιούνται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση.**

Στη συνέχεια, έγινε πέψη περίπου 0,5μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τα ένζυμα *SspI* και *BglII*, με σκοπό έναν προκαταρκτικό έλεγχο της πλασμιδιακής κατασκευής. Τα προϊόντα της πέψης ελέγχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και η εκτίμηση των μεγεθών των ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση έγινε με δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών (ladder 1000bp). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην Εικόνα 9. Το κυκλικό πλασμίδιο δείχνει δύο ζώνες πιθανώς λόγω ποσοστού υπερελικωμένης διαμόρφωσης. Επίσης, το γραμμικό πλασμίδιο που έχει τεμαχιστεί με το ένζυμο *ScaI* εμφανίζεται στις 6000bp αλλά λόγω της μεγάλης ποσότητας DNA που περιέχει δίνει μια πολύ έντονη ζώνη. Στην πέψη με το ένζυμο *BglII* εμφανίζονται τρεις



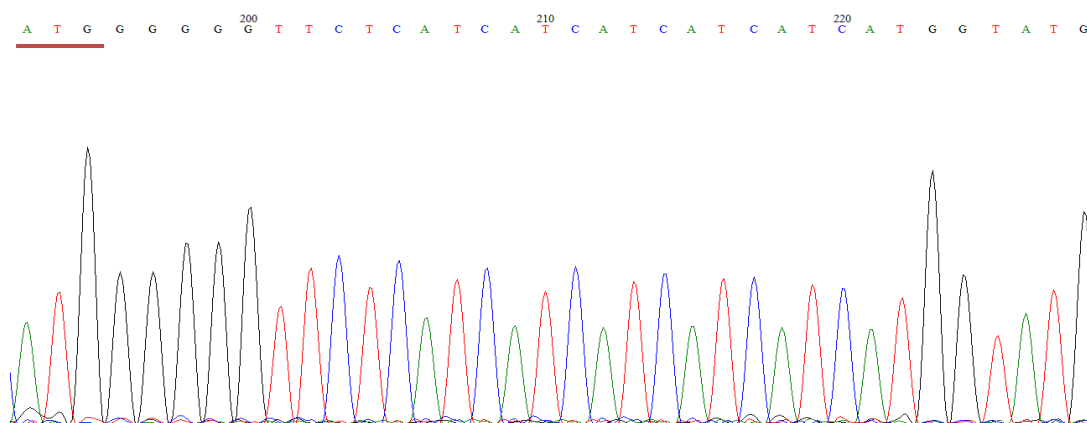
ζώνες, καθώς τεμαχίζει το πλασμίδιο σε τρεις θέσεις. Ωστόσο, λόγω του παρόμοιου μικρού μεγέθους των δύο μικρότερων προϊόντων της πέψης (438bp και 688bp) δεν είναι δυνατός ο ξεκάθαρος διαχωρισμός τους καθώς το πήκτωμα είναι συγκέντρωσης 1%, λόγω των υπόλοιπων μεγάλων τμημάτων που ηλεκτροφορήθηκαν.



**Εικόνα 9.** Ηλεκτροφόρηση πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pcDNA 4/TO-FRA10AC1* σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Εμφανίζονται L: ladder 1000bp, 1: άκοπο πλασμίδιο, 2: Γραμμικό πλασμίδιο, 3: πέψη με το ένζυμο *BglIII*, 4: πέψη με το ένζυμο *SspI*.

### 3.1.2. Έλεγχος πλασμιδιακής κατασκευής μέσω αλληλούχησης

Η χρήση περιοριστικών ενζύμων για τον έλεγχο της πλασμιδιακής κατασκευής είναι ένας αδρός έλεγχος καθώς δεν μπορούμε να κρίνουμε αν το επιθυμητό ένθεμα παρουσιάζει μικροελλείμματα. Για αυτό το λόγο, έγινε έλεγχος του ενθέματος και με αλληλούχηση. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CMV και BGH (Εικόνα 9) οι οποίοι προτείνονται από το εγχειρίδιο της εταιρίας Invitrogen από την οποία προέρχεται ο φορέας *pcDNA4/TO*. Οι θέσεις που υβριδοποιούνται οι εκκινητές στον φορέα εντοπίζονται αντίστοιχα στις θέσεις CMV forward priming site (769-789bp) και BGH reverse priming site (1089-1106bp). Από την ανάλυση της αλληλούχησης με το πρόγραμμα BioEdit και ύστερα από στοίχιση των αλληλουχιών, επιβεβαιώθηκε η ακεραιότητα του ενθέματος (Εικόνα 10).

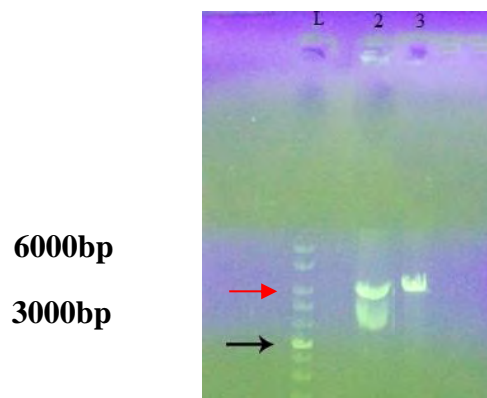


**Εικόνα 10:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα που προέκυψε από αλληλούχηση του ενθέματος *FRA10AC1* στον φορέα *pcDNA4TO*.. Φαίνονται ενδεικτικά 40 bp της αλληλουχίας που περιέχει υπογραμμισμένο το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

### 3.1.3. Γραμμοποίηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έγινε γραμμικό με το ένζυμο *ScaI* το οποίο τεμαχίζει τον φορέα στις 4635bp, καθοδικά του γονιδίου ανθεκτικότητας στη ζεοσίνη. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε η γραμμοποίηση του πλασμιδίου είναι επειδή το γραμμικό DNA ανασυνδυάζεται πιο εύκολα με το χρωμόσωμα σε σχέση με το κυκλικό DNA το οποίο θα χρειαστεί να υποστεί πρώτα θραύση ενδοκυτταρικά, ώστε να γίνει γραμμικό, με συνέπεια να μην είναι τόσο πιθανή η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή (vonGroll et al. 2006). Επιπλέον, επειδή η θραύση είναι τυχαία μπορεί να λάβει χώρα σε οποιοδήποτε σημείο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου καταστρέφοντας πιθανώς λειτουργικά τμήματά του όπως π.χ. στο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, σε υποκινητές ή στο ένθεμα. Έτσι, επιλέχθηκε η γραμμοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου πριν την διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa*. Συνολικά γραμμοποιήθηκαν 50μg γραμμικού πλασμιδίου αφού χρειάζονται περίπου 20μg πλασμιδίου ανά διαμόλυνση τρυβλίου μεγέθους 10cm<sup>2</sup>.

Στην Εικόνα 11 ηλεκτροφορήθηκε εκ νέου του κυκλικού, άκοπου πλασμιδίου και του γραμμικού πλασμιδίου ώστε να αυξηθεί η ευκρίνεια απεικόνισης των ζωνών τους. Στην θέση ηλεκτροφόρησης 3 φαίνεται ότι το πλασμίδιο έγινε γραμμικό, αφού η κινητικότητά του, που αντιστοιχεί σε ~6kb, παρουσιάζεται διαφορετική σε σχέση με το άκοπο κυκλικό πλασμίδιο. Το κυκλικό παορυσιάζει όπως φάνηκε και στην εικόνα 10 δύο ζώνες.



**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση κυκλικού και γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου **pcDNA 4/TO-FRA10AC1** σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Εμφανίζεται με L: Ladder, 2: κυκλικό πλασμίδιο, 3: γραμμικό πλασμίδιο έπειτα από πέψη με το ένζυμο *ScaI*.

Το γραμμικό πλασμιδιακό DNA καθαρίστηκε από πρωτεΐνες μέσω εκχύλισης με φαινόλη και κατακρήμνισή του με αλκοόλη. Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικοποίηση του.

### 3.2. Ποσοτικοποίηση DNA

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας γραμμικού DNA έγινε φωτομέτρηση στα 260nm, όπου τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους. Η συγκέντρωση του DNA ήταν 660 ng/μl. Με την αναγωγή, η ποσότητα γραμμικού DNA που συνολικά απομονώθηκε ήταν ~49 μg. Επίσης, με τη χρήση του φωτόμετρου έγινε και ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA, με την χρήση του λόγου  $\lambda=260/280$ , ο οποίος προσδιορίστηκε στο  $\lambda=1,77$ . Ο λόγος αυτός δείχνει την περιεκτικότητα του διαλύματος DNA σε πρωτεΐνες που περιέχονται από την διαδικασία της απομόνωσης. Ο επιθυμητός λόγος είναι από  $> 1,8$ , όσον αφορά το DNA. Έτσι, ο λόγος αν και στο όριο, είναι αποδεκτός για την συνέχεια της διαδικασίας της διαμόλυνσης. Με την χρήση του φωτομέτρου λοιπόν, φάνηκε ότι τόσο η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα όσο και η ποιότητά του, όσον αφορά την καθαρότητα σε πρωτεΐνες είναι αποδεκτός και επαρκής για την διαδικασία της διαμόλυνσης.

### 3.3. Διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με το ανασυνδυασμένο pcDNA 4/TO-FRA10AC1

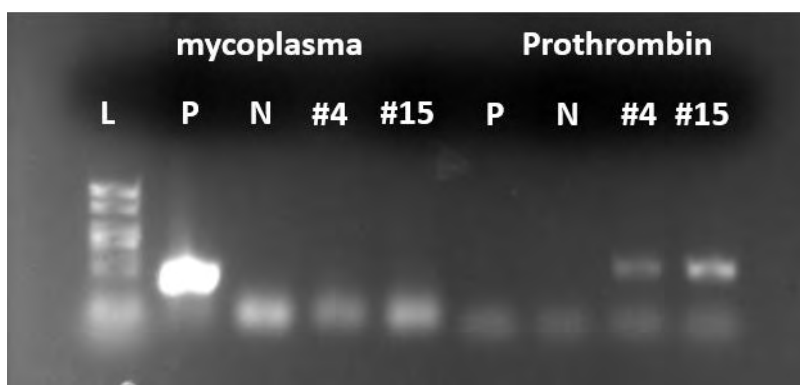
#### 3.3.1. Έλεγχος ύπαρξης μυκοπλάσματος στις κυτταρικές σειρές *HeLa*

Κατά τον χειρισμό των κυττάρων *HeLa* υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης με βακτήρια και μύκητες, εάν δεν είναι σωστός ο χειρισμός τους. Τέτοιου είδους μολύνσεις μπορούν να

παρατηρηθούν εύκολα με την βοήθεια μικροσκοπίου λόγω των αλλοιώσεων που προκαλούν στις καλλιέργειες των κυττάρων. Όμως, μολύνσεις είτε από ιούς, είτε από το βακτήριο μυκόπλασμα, δεν είναι ορατή και για αυτό απαιτείται ο έλεγχος με PCR.

Έτσι, έγινε απομόνωση ολικού DNA από κύτταρα *HeLa* με σκοπό τον έλεγχο τους για παρουσία μυκοπλάσματος το οποίο είναι ένα βακτήριο χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Το DNA που απομονώθηκε, χρησιμοποιήθηκε για PCR για την ανίχνευση του μυκοπλάσματος, διότι στα αρχικά στάδια της μόλυνσης τα κύτταρα δεν φαίνονται να επηρεάζονται καθώς τα βακτήρια επικάθονται στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς να δρουν τοξικά. Ωστόσο, σε μετέπειτα στάδια της μόλυνσης ανταγωνίζονται τα κύτταρα σε θρεπτικά συστατικά και προκαλούν διαταραχές στην σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών δημιουργώντας τον κίνδυνο αλλοίωσης των αποτελεσμάτων του πειράματος. Για τον λόγο αυτό έγινε έλεγχος για την ύπαρξη μυκοπλάσματος συνολικά δύο φορές. Αρχικά, έγινε έλεγχος στους δύο διαθέσιμους κλώνους κυττάρων *HeLa* (#4, #15) με ενσωματωμένο το πλασμίδιο 6TR και στην συνέχεια της ανακαλλιέργειας στον κλώνο #4 που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία της διαμόλυνσης. Για την διαδικασία ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές MGSO, GPO-3 που ενισχύουν το γενετικό υλικό του βακτηρίου του μυκοπλάσματος. Επίσης, για τον θετικό έλεγχο της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PRO\_f, PRO\_r που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου της προθρομβίνης λόγω του παρόμοιου μεγέθους προϊόντων που δίνει η ενίσχυσή του με το προϊόν του μυκοπλάσματος και για την διασφάλιση της πιστότητας της αντίδρασης (βλ. κεφ. 2.7). Οι εκκινητές για το μυκόπλασμα, ενισχύουν μια αλληλουχία 288bp. Το προϊόν που εμφανίζεται από την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της προθρομβίνης είναι ~350bp. Ακόμη, χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας και ένας θετικός μάρτυρας, δείγμα DNA από κύτταρα μολυσμένα με μυκόπλασμα. Το είδος της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ήταν η C2C12 (κύτταρα ποντικού). Μετά την πραγματοποίηση της PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 12. Φαίνεται ότι δεν υπάρχει μόλυνση των κλώνων από το μυκόπλασμα καθώς δεν εμφανίζεται ζώνη όπως στον θετικό μάρτυρα. Επίσης, επιβεβαιώνεται η ποιότητα και η ποσότητα του γενωμικού DNA καθώς ενισχύθηκαν τμήματα του γονιδίου της προθρομβίνης στους κλώνους των κυττάρων *HeLa*. Ωστόσο, δεν ενισχύθηκε το γονίδιο της προθρομβίνης στον θετικό μάρτυρα, καθώς, όπως προαναφέρθηκε το απομονωμένο DNA του θετικού μάρτυρα ανήκει σε κύτταρα

ποντικού. Αυτό δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα του ελέγχου καθώς ενισχύθηκε το DNA του μυκοπλάσματος στον θετικό μάρτυρα με τους εκκινητές του μυκοπλάσματος και αφετέρου, ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου της προθρομβίνης στους κλώνους #4 και #15 των κυττάρων *HeLa*.

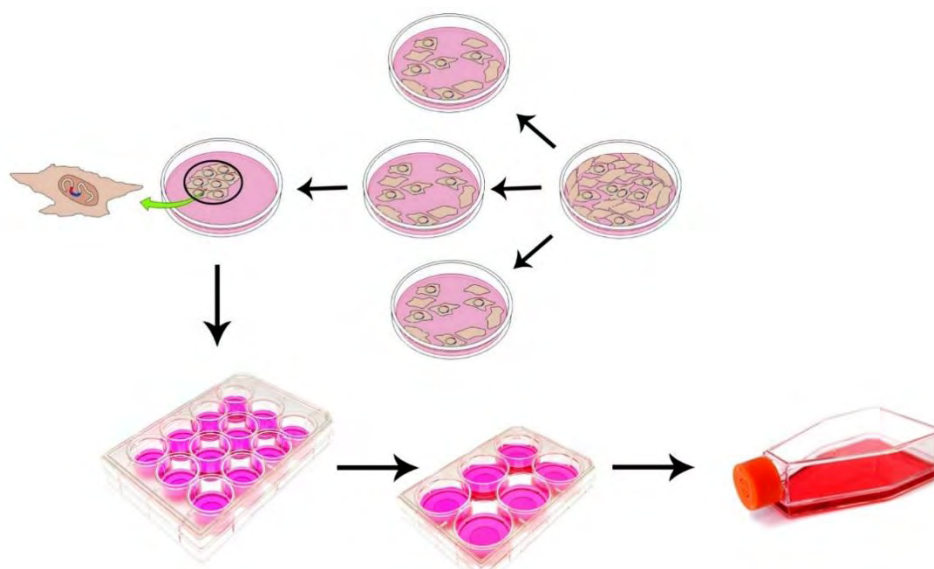


**Εικόνα 12.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για τον έλεγχο ύπαρξης μυκοπλάσματος σε κλώνους *HeLa*, με γονίδιο ελέγχου την προθρομβίνη, σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Συμβολίζονται με L: Ladder (100bp), P: θετικός μάρτυρας μυκοπλάσματος, N: αρνητικός μάρτυρας, #4, #15: οι κλώνοι των *HeLa*.

### 3.4. Διαμόλυνση και επιλογή αποικιών

Για τη δημιουργία της σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa* που εκφράζει επαγόμενα το γονίδιο *FRA10AC1* μέσω του γονιδίου του καταστολέα της τετρακυκλίνης, TetR, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο που βασίζεται στην συγκατακρήμνιση του DNA με  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο (βλ. ενότητα 2). Ένας κλώνος κυττάρων (#4) που εκφράζει τον καταστολέα της τετρακυκλίνης επιλέχθηκε για να διαμολυνθεί με το διαγονίδιο pcDNA4/TO-*FRA10AC1* ώστε να δημιουργηθεί η σταθερή διπλά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά. Για το μίγμα της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν 20μg γραμμικού πλασμιδίου, ανά τρυβλίο (10cm). Μετά από 24h πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση των κυττάρων και επανακαλλιέργειά τους σε τρία τρυβλία μεγέθους 10cm ώστε να υπάρχει κάλυψη επιφάνειας της τάξης του 25% για να δράσει το μέσο επιλογής, το αντιβιοτικό ζεοσίνη. Μετά από 12h έγινε αλλαγή θρεπτικού μέσου και προσθήκη νέου με κατάλληλες συγκεντρώσεις ζεοσίνης (400, 600 και 800 μg/ml). Αυτές οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν γιατί φάνηκε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στον τρόπο με τον οποίο θανατώνονται τα κύτταρα.(βλ. Υλικά και Μέθοδοι) και κάθε τρεις μέρες γινόταν αλλαγή του θρεπτικού με το αντιβιοτικό.

Στην συγκέντρωση των 800μg/ml και 600μg/ml παρατηρήθηκε πολύ γρήγορος θάνατος και δεν ήταν δυνατή η επιλογή κλώνων. Στη συγκέντρωση των 400μg/ml υπήρχε πιο αργός ρυθμός θανάτου στα κύτταρα. Η διάρκεια επιλογής ήταν περίπου 20 ημέρες. Καθ' όλη την διάρκεια της επιλογής γινόταν συνεχής αλλαγή θρεπτικού μέσου με ζεοσίνη ανά 2-3 ημέρες. Μετά το πέρας των ~20 ημερών τα κύτταρα *HeLa* που είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου, επιβίωσαν και προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια του τρυβλίου σχηματίζοντας συνολικά δύο αποικίες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν παρουσία ζεοσίνης σε τρυβλίο 12 θέσεων. Οι κλώνοι αυτοί θα πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω ώστε να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση και έκφραση του διαγονιδίου (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13: Ενδεικτική σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της επιλογής κυττάρων.** Κύτταρα κάλυψης ~80% διαμολύνονται με το επιθυμητό διαγονίδιο, στη συνέχεια γίνεται θρυψινοποίηση και αραίωση των κυττάρων σε ποσοστό κάλυψης ~25% και προστίθεται το μέσο επιλογής, η ζεοσίνη. Μετά από μέρες τακτικής αλλαγής θρεπτικού μέσου και ξέπλυσης των κυττάρων με PBS επιλέγονται αποικίες κυττάρων που έχουν το επιθυμητό γονίδιο. Μεταφέρεται η κάθε αποικία σε πλάκα 12well και σταδιακά μεταφέρονται σε όλο και μεγαλύτερη επιφάνεια μέχρι το πάγωμά τους.

#### 4. Συμπέρασμα

Στη παρούσα εργασία έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με την πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA4TO/*FRA10AC1* για την επαγόμενη υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* μέσω του συστήματος TREX. Απ' τη διαδικασία αυτή επιλέχθηκαν δύο κλώνοι κυττάρων *HeLa* που φέρουν το επιθυμητό διαγονίδιο. Θα πρέπει να γίνει έλεγχος της υπερέκφρασης του γονιδίου και η ρύθμιση κατάλληλης συγκέντρωσης αναλόγου της τετρακυκλίνης για να μπορέσει να καθοριστεί η τάξη μεγέθους της υπερέκφρασης. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της *FRA10AC1* σε σχέση και με ρυθμιστικούς παράγοντες στο σωματίο συναρμογής όπως π.χ. οι DGCR14, SF3B2 κ.α. με στόχο την κατανόηση της λειτουργίας του *FRA10AC1*. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ομικές τεχνολογίες σε μεταβολικό, μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο.

## 5. Βιβλιογραφία

- Agafonov, D. E., J. Deckert, E. Wolf, P. Odenwalder, S. Bessonov, C. L. Will, H. Urlaub, and R. Luhrmann. 2011. "Semiquantitative Proteomic Analysis of the Human Spliceosome via a Novel Two-Dimensional Gel Electrophoresis Method." *Molecular and Cellular Biology* 31 (13):2667–82. <https://doi.org/10.1128/MCB.05266-11>.
- Bessonov, Sergey, Maria Anokhina, Andrius Krassauskas, Monika M Golas, Bjoern Sander, Cindy L Will, Henning Urlaub, Holger Stark, and Reinhard Lu. 2010. "Characterization of Purified Human B." *RNA*, 2384–2403. <https://doi.org/10.1261/rna.2456210.observed>.
- Bhowmick, Rahul, and Ian D Hickson. 2017. "The 'Enemies within': Regions of the Genome That Are Inherently Difficult to Replicate." *F1000Research* 6 (May):666. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11024.1>.
- Braunschweig, Ulrich, Serge Gueroussov, Alex M. Plocik, Brenton R. Graveley, and Benjamin J. Blencowe. 2013. "Dynamic Integration of Splicing within Gene Regulatory Pathways." *Cell* 152 (6). Elsevier Inc.:1252–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.034>.
- Chung, C T, S L Niemela, and R H Miller. 1989. "One-Step Preparation of Competent Escherichia Coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7). National Academy of Sciences:2172–75. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.7.2172>.
- Davidson, Lee, Lisa Muniz, and Steven West. 2014. "3' End Formation of Pre-mRNA and Phosphorylation of Ser2 on the RNA Polymerase II CTD Are Reciprocally Coupled in Human Cells." *Genes & Development* 28 (4). Cold Spring Harbor Laboratory Press:342–56. <https://doi.org/10.1101/gad.231274.113>.
- Elbarbary, Reyad A., and Lynne E. Maquat. 2016. "Coupling Pre-mRNA Splicing and 3' End Formation to mRNA Export: Alternative Ways to Punch the Nuclear Export Clock." *Genes & Development* 30 (5):487–88. <https://doi.org/10.1101/gad.278937.116>.
- Fabrizio, Patrizia, and Reinhard Lührmann. 2012. "The Spliceosome in Constitutive Splicing." *Alternative Pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols*, 49–64. <https://doi.org/10.1002/9783527636778.ch5>.
- Fei, Dennis Liang, Hayley Motowski, Rakesh Chatrikhi, Sameer Prasad, Jovian Yu, Shaojian Gao, Clara L. Kielkopf, Robert K. Bradley, and Harold Varmus. 2016. "Wild-Type U2AF1 Antagonizes the Splicing Program Characteristic of U2AF1-Mutant Tumors and Is Required for Cell Survival." Edited by H. Leighton Grimes. *PLOS Genetics* 12 (10):e1006384. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006384>.
- Garibyan, Lilit, and Nidhi Avashia. 2013. "Polymerase Chain Reaction." *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (3). NIH Public Access:1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Graham, F L, and A J van der Eb. 1973. "A New Technique for the Assay of Infectivity



- of Human Adenovirus 5 DNA.” *Virology* 52 (2):456–67.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4705382>.
- Hadjikyriacou, Andrea, Yanzhong Yang, Alexandra Espejo, Mark T Bedford, and Steven G Clarke. 2015. “Unique Features of Human Protein Arginine Methyltransferase 9 (PRMT9) and Its Substrate RNA Splicing Factor SF3B2.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (27). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:16723–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659433>.
- Hall, T.A. 1999. “BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis 41:95-98., Program for Windows 95/98/NT.” *Nucl. Acids. Symp. Ser.*
- Hegele, Anna, Atanas Kamburov, Arndt Grossmann, Chrysovalantis Sourlis, Sylvia Wowro, Mareike Weimann, Cindy L. Will, Vlad Pena, Reinhard Lührmann, and Ulrich Stelzl. 2012. “Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome.” *Molecular Cell* 45 (4):567–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.034>.
- Herzel, Lydia, Diana S.M. Ottoz, Tara Alpert, and Karla M. Neugebauer. 2017. “Splicing and Transcription Touch Base: Co-Transcriptional Spliceosome Assembly and Function.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (10). Nature Publishing Group:637–50. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.63>.
- Hillen, Wolfgang, and Christian Berens. 1994. “EXPRESSION OF TNIO Wolfgang Hillen and Christian Berens.” *Annual Review of Microbiology* 48:345–69.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002021>.
- Hir, Hervé Le, Jérôme Saulière, and Zhen Wang. 2016. “The Exon Junction Complex as a Node of Post-Transcriptional Networks.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (1). Nature Publishing Group:41–54.  
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>.
- Invitrogen. 2011a. “PcDNA™ 4/TO,” no. 25.
- Invitrogen. 2011b. “T-REx™ System Manual,” no. 25:2.
- Keown, Wayne A., Collin R. Campbell, and Raju S. Kucherlapati. 1990. “Methods for Introducing DNA into Mammalian Cells,” 527–37.
- Kim, Tae Kyung, and James H Eberwine. 2010. “Mammalian Cell Transfection: The Present and the Future.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (8). Springer:3173–78. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>.
- Kingston, Robert E., Claudia A. Chen, and Hiroto Okayama. 2003. “Precipitate Formed in Hepes.” *Current Protocols in Cell Biology*, 1–8.
- Konarska, Maria M., Josep Vilardell, and Charles C. Query. 2006. “Repositioning of the Reaction Intermediate within the Catalytic Center of the Spliceosome.” *Molecular Cell* 21 (4):543–53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.017>.
- Kooy, R Frank. 2009. “Fragile Sites and Human Disease.” *Life Sciences*, no. March. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021457>.
- Kotake, Yoshihiko, Koji Sagane, Takashi Owa, Yuko Mimori-Kiyosue, Hajime

- Shimizu, Mai Uesugi, Yasushi Ishihama, Masao Iwata, and Yoshiharu Mizui. 2007. "Splicing Factor SF3b as a Target of the Antitumor Natural Product Pladienolide." *Nature Chemical Biology* 3 (9):570–75. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.16>.
- Maniatis, Tom, and Robin Reed. 2002. "An Extensive Network of Coupling among Gene Expression Machines." *Nature* 416 (6880). Nature Publishing Group:499–506. <https://doi.org/10.1038/416499a>.
- Masters, John R. 2002. "TIMELINEHeLa Cells 50 Years on: The Good, the Bad and the Ugly." *Nature Reviews Cancer* 2 (4). Nature Publishing Group:315–19. <https://doi.org/10.1038/nrc775>.
- Nilsen, Timothy W., and Brenton R. Graveley. 2010. "Expansion of the Eukaryotic Proteome by Alternative Splicing." *Nature* 463 (7280):457–63. <https://doi.org/10.1038/nature08909>.
- Pabis, Marta, Noa Neufeld, Michaela C Steiner, Teodora Bojic, Yaron Shav-Tal, and Karla M Neugebauer. 2013. "The Nuclear Cap-Binding Complex Interacts with the U4/U6·U5 Tri-SnRNP and Promotes Spliceosome Assembly in Mammalian Cells." *RNA (New York, N.Y.)* 19 (8). Cold Spring Harbor Laboratory Press:1054–63. <https://doi.org/10.1261/rna.037069.112>.
- Papasaikas, Panagiotis, J. Ramón Tejedor, Luisa Vigevari, and Juan Valcárcel. 2015. "Functional Splicing Network Reveals Extensive Regulatory Potential of the Core Spliceosomal Machinery." *Molecular Cell* 57 (1):7–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.030>.
- Proudfoot, Nick J., Andre Furger, and Michael J. Dye. 2002. "Integrating MRNA Processing with Transcription." *Cell* 108 (4). Cell Press:501–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00617-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00617-7).
- Rawlings, Neil D., and Alan J. Barrett. 1994. "[2] Families of Serine Peptidases." *Methods in Enzymology* 244 (January). Academic Press:19–61. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44004-2).
- Saldi, Tassa, Michael A. Cortazar, Ryan M. Sheridan, and David L. Bentley. 2016. "Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing." *Journal of Molecular Biology* 428 (12):2623–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.017>.
- Sambrook, J., and W Russel, D. 2000. *Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harboc Laboratory Press. Vol. 3. <https://doi.org/10.1002/abio.370050118>.
- Sarafidou, Theologia, Christina Kahl, Isabel Martinez-Garay, Marie Mangelsdorf, Stefan Gesk, Elizabeth Baker, Maria Kokkinaki, et al. 2004. "Folate-Sensitive Fragile Site FRA10A Is Due to an Expansion of a CGG Repeat in a Novel Gene, FRA10AC1, Encoding a Nuclear Protein." *Genomics* 84 (1):69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.017>.
- Schwartz, Michal, Eitan Zlotorynski, and Batsheva Kerem. 2006. "The Molecular Basis of Common and Rare Fragile Sites." *Cancer Letters* 232 (1):13–26.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.039>.

- Song, Fei, Chuandong Fan, Xinjiang Wang, and David W. Goodrich. 2013. "The Thoc1 Encoded Ribonucleoprotein Is a Substrate for the NEDD4-1 E3 Ubiquitin Protein Ligase." Edited by Thomas G. Hofmann. *PLoS ONE* 8 (2):e57995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057995>.
- Sutherland, G R. 1979. "Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes. IV. Silver Staining." *Hum Genet* 53 (1):29–30.
- Takada, Ichiro. 2015. "DGCR14 Induces *Il17a* Gene Expression through the ROR $\gamma$ /BAZ1B/RSKS2 Complex." *Molecular and Cellular Biology* 35 (2):344–55. <https://doi.org/10.1128/MCB.00926-14>.
- Tanackovic, Goranka, Adriana Ransijn, Philippe Thibault, Sherif Abou Elela, Roscoe Klinck, Eliot L. Berson, Benoit Chabot, and Carlo Rivolta. 2011. "PRPF Mutations Are Associated with Generalized Defects in Spliceosome Formation and Pre-mRNA Splicing in Patients with Retinitis Pigmentosa." *Human Molecular Genetics* 20 (11):2116–30. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr094>.
- Turunen, Janne J., Elina H. Niemelä, Bhupendra Verma, and Mikko J. Frilander. 2013. "The Significant Other: Splicing by the Minor Spliceosome." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (1):61–76. <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>.
- Ulrich, Alexander K. C., and Markus C. Wahl. 2017. "Human MFAP1 Is a Cryptic Ortholog of the *Saccharomyces Cerevisiae* Spp381 Splicing Factor." *BMC Evolutionary Biology* 17 (1):91. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0923-1>.
- vonGroll, A., Y. Levin, M.C. Barbosa, and A.P. Ravazzolo. 2006. "Linear DNA Low Efficiency Transfection by Liposome Can Be Improved by the Use of Cationic Lipid as Charge Neutralizer." *Biotechnology Progress* 22 (4):1220–24. <https://doi.org/10.1021/bp060029s>.
- Wahl, Markus C., Cindy L. Will, and Reinhard Lührmann. 2009. "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine." *Cell* 136 (4):701–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>.
- Will, Cindy L, and Reinhard Lührmann. 2011. "Spliceosome Structure and Function. TL - 3." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 VN-re (7):1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>.
- Yao, Feng, Tor Svensjo, Thomas Winkler, Michael Lu, Carl Eriksson, and Elof Eriksson. 1998. "Tetracycline Repressor, TetR, Rather than the Cell Transcription Factor Fusion Derivatives, Regulates Inducible Gene Expression in Mammalian Cells." *Human Gene Therapy* 9:1939–50.
- Yao, Tatsuma, and Yuta Asayama. 2017. "Animal-Cell Culture Media: History, Characteristics, and Current Issues." *Reproductive Medicine and Biology* 16 (2):99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.
- Yoder, Freda E., Russell A. Vincent, Samuel K. Morgan, and Owen C. Grush. 2007. "Chromosome Fragile Sites." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 14 (3–4):369. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(85\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0165-4608(85)90202-X).

Young, Lesley, Julia Sung, Glyn Stacey, and John R Masters. 2010. "Detection of Mycoplasma in Cell Cultures." *Nature Protocols* 5 (5):929–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>.